

Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde  
der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

## DISSERTATION

# **Experimentelle Melanin-induzierte Uveitis**

## **Modulation der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion durch Makrophagendepletion - Intravitalmikroskopische Analysen -**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Joachim Puchta  
aus Dresden

Dekan: Prof. Dr. med. J. W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. U. Pleyer  
2. Prof. Dr. med. J. Wollensak  
3. Prof. Dr. med. F. Krombach

Datum der Promotion: 23.11.2001

**Meinen Eltern und Lehrern.**

## **Inhaltsverzeichnis**

<b><u>1</u></b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b><u>8</u></b>
1.1	Anatomie und Physiologie der Uvea	8
1.2	Entzündungen der Uvea – Epidemiologie und Ätiologie	8
1.3	Tiermodelle der nichtinfektiösen Uveitis	9
1.3.1	Experimentelle Melaninprotein-induzierte Uveitis (EMIU)	9
1.4	Therapiemöglichkeiten der Uveitis	10
1.5	Antigenpräsentierende Zellen im Vorderabschnitt des Auges	11
1.6	Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	12
1.7	Intravitalmikroskopie	14
1.8	Clodronat	14
<b><u>2</u></b>	<b><u>Material und Methoden</u></b>	<b><u>15</u></b>
2.1	Tiere	15
2.2	Antigenpräparation	15
2.3	Vorversuche	15
2.3.1	Dosisfindung des uveitogenen Melaninproteins	15
2.3.2	Induktion der EMIU ohne Adjuvantien	15
2.4	Induktion der EMIU	15
2.5	Makrophagendepletion bei EMIU mit liposomal verkapseltem Clodronat	16
2.5.1	Liposomenherstellung	16
2.6	Kontrollen	17
2.7	Intravital-Fluoreszenz-Mikroskopie	17
2.8	Videosequenzanalyse	19
2.9	Blut-/Plasmaanalyse	19
2.10	Kammerwasseranalyse	19
2.11	Immunohistologie der Milz	19
2.12	Software	20
2.13	Statistik	20



<b>3</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b>	<b>21</b>
<b>3.1</b>	<b>Vorversuche</b>	<b>21</b>
3.1.1	Dosisfindung des uveitogenen Melaninproteins	21
3.1.2	Induktion der EMIU ohne Adjuvantien	21
3.1.3	Intravital-Fluoreszenz-Mikroskopie	21
<b>3.2</b>	<b>Experimentelle Melanin-induzierte Uveitis</b>	<b>25</b>
3.2.1	Intravital-Fluoreszenz-Mikroskopie/ Videosequenzanalyse	25
3.2.2	Kammerwasseranalyse	27
3.2.3	Blutbild	29
3.2.4	Blutplasmaanalyse	31
3.2.5	Immunohistologie der Milz	32
<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i></b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b>	<b>38</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ARVO	Association for Research in Vision and Ophthalmology
BMA	bovines Melanin-assoziiertes Antigen
C5a	aktivierter Komplementfaktor 5
CD	Cluster of Differentiation
CFA	Complete Freund's Adjuvans
CL <sub>2</sub> MBP	Clodronat, Clodronsäure, Dichlormethylendiphosphonat (DMDP)
EAAU	Experimentelle autoimmune anteriore Uveitis (Synonym: EMIU)
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalitis
EAN	Experimentelle autoimmune Neuritis
EAPU	Experimentelle autoimmune Pigmentepithelmembran-Protein-induzierte Uveitis
EAU	Experimentelle autoimmune Uveitis
EIU	Endotoxin induzierte Uveitis
ELAM	endothelial-leucocyte adhesion molecule
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMIU	Experimentelle Melaninprotein-induzierte Uveitis
ESL	E-selectin ligand
FMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
GlyCAM	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule
GM-CSF	Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor
HLA	human leucocyte antigen (Synonym: MHC)
i.p.	intraperitoneal
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1; CD11a-CD18
LPS	Lipopolysaccharide (Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien)
LTB <sub>4</sub>	Leukotrien B <sub>4</sub>
Mac-1	macrophage-1 antigen; CD11b-CD18
MAdCAM	mucosal addressin cell adhesion molecule
MCP	monocyte chemotactic protein
MHC	major histocompatibility complex
MIP	macrophage inflammatory protein
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
N.	Nervus (Nn. – Plural)
p.i.	post immunisationem
PAF	platelet-activating factor
PBS	phosphate buffered saline
PECAM	platelet-endothelial cell adhesion molecule
PEP-65	ein aus retinalem Gewebe aufgereinigtes Peptid
PSGL	P-selectin glycoprotein ligand
PTX	Pertussistoxin
RPE	Retinales Pigmentepithel
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SF	Standardfehler
SLeA/X	sialyl-Lewis-a/x
TBS	TRIS buffered saline
TGF	transforming growth factor
TH	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
VCAM	vascular cell adhesion molecule
Vv.	Venae

## Fragestellung

Die experimentelle Melaninprotein-induzierte Uveitis (EMIU) ist ein Modell für die nichtinfektiöse Uveitis anterior (Broekhuysen 1992, Broekhuysen 1993b). Zehn Tage nach der Immunisation mit bovinem Melaninprotein werden die Iris und der Ziliarkörper, seltener die Choroidea von Lewisratten zellulär infiltriert (McMenamin 1997b). Die okuläre Entzündung rezidiert ohne erneute Antigenexposition (Broekhuysen 1995). Die EMIU eignet sich zur Untersuchung modulierender Faktoren intraokularer Entzündungsprozesse: wie der Zytokinfreisetzung, der humoralen und zellulären Immunantwort sowie der Analyse der Leukozytenrekrutierung in okuläres Gewebe.

Eine Hauptfunktion von Makrophagen ist die Präsentation von prozessiertem Antigen gegenüber Lymphozyten (Dijkstra 1992, Unanue 1984). Weitere wichtige Funktionen sind die parakrine immunmodulierende Stimulation weiterer Zellen durch die Freisetzung von Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2 und IL-6. Durch selektive Depletion von Makrophagen eines Organismus besteht die Möglichkeit, ihre Rolle innerhalb des Entzündungsprozesses zu untersuchen (Deleamarre 1990, van Rooijen 1992).

Eine Entzündungsreaktion ist unter anderem durch den Influx von Entzündungszellen in betroffene Gewebe gekennzeichnet. Der Akkumulation von Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen gehen differenziert regulierte Prozesse der Zellextravasation voran. Innerhalb des Gefäßbettes kommen Leukozyten zufällig in Kontakt mit aktivierten Endothelzellen. Diese exprimieren auf ihrer luminalen Oberfläche Adhäsionsmoleküle, die weitere Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothelzellen erlauben. Im Verlauf der Entzündungsreaktion rollen Leukozyten an der Gefäßwand entlang und bleiben an dieser fest haften. Diesen Stadien folgt bei weiter bestehendem Stimulus die Extravasation der Leukozyten.

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, Auswirkungen einer Makrophagendepletion bei der autoimmunen anterioren Uveitis (EMIU) zu analysieren. Unter Nutzung der Intravitalmikroskopie wurde die Leukozytenrekrutierung bei der EMIU durch Quantifizierung der Zell-Zell-Interaktion zwischen vaskulärem Endothel und Leukozyten untersucht. Zur Charakterisierung der frühen Entzündungsreaktion wurden weitere Entzündungsparameter wie Zellzahl und Proteingehalt des Kammerwassers sowie die Konzentration der Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  im Plasma herangezogen.

# 1 Einleitung

## 1.1 Anatomie und Physiologie der Uvea

Die Uvea (Tunica vasculosa) liegt als mittlere Augenhaut zwischen der Sklera (Tunica fibrosa) und Retina (Tunica nervosa oder interna). Anatomisch kann sie in Choroidea, Corpus ciliare und Iris eingeteilt werden.

Die zweischichtigen Epithelien von Iris und Ziliarkörper sind ontogenetisch neuro-ektodermalen Ursprungs. Auch die Muskulatur der Iris und die Chromatophoren sind ektodermaler Herkunft, wobei sich letztere während der fetalen Entwicklung nach Einwanderung aus dem Neuralrohr entwickeln (Funk 1997). Indessen sind alle weiteren Anteile der Uvea mesodermalen Ursprungs.

Am Menschen erfolgt die arterielle Versorgung der Uvea über die Aa. ciliares posteriores breves et posteriores longae und Aa. ciliares anteriores. Sie werden aus der A. ophthalmica gespeist.

Der venöse Abfluss ist über zumeist 4 Vv. vorticosae gesichert. In der Nähe des Bulbusäquators durchdringen sie die Sklera und münden in die Vv. ophthalmicae superiores et inferiores (Funk et al 1997).

Die Innervation der Uvea erfolgt über die Nn. ciliares breves et longae. Die kurzen Ziliarnerven entspringen dem Ganglion ciliare und führen sensible (aus dem N. nasociliaris), sympathische (aus dem Plexus caroticus) und parasympathische Fasern (aus dem N. oculomotorius) mit sich. Die langen Ziliarnerven entspringen dem N. nasociliaris. Sie enthalten nur sensible Fasern (Funk et al 1997).

Die Iris reguliert durch ihre Fähigkeit zur Dilatation und Konstriktion den Lichteinfall auf die Retina.

Der Ziliarkörpermuskel dient der Akkomodation. Das nichtpigmentierte Epithel der Processus ciliares sezerniert das Kammerwasser, das sowohl für die Ernährung der Hornhaut, des Glaskörpers und der Linse als auch zur Aufrechterhaltung des intraokularen Drucks erforderlich ist. Durch die Pupille strömt es aus der Hinter- in die Vorderkammer und von dort fließt es über das Trabekelwerk und den Schlemm-Kanal in die venöse Blutbahn ab (Funk et al 1997).

Die gefäßreiche Choroidea ist das Haupternährungsorgan des Bulbus. Allerdings ist der Blutfluss durch die Aderhaut um ein Vielfaches stärker ausgeprägt als in anderen Geweben des Körpers wie z.B. Herz oder Nierenrinde. Es ist wahrscheinlich, dass die Choroidea zusätzlich der Temperaturregulation des Auges dient (Alm 1992, Rummelt und Naumann 1997).

## 1.2 Entzündungen der Uvea – Epidemiologie und Ätiologie

Mit dem Begriff der Uveitis wird die entzündliche Erkrankung der Uvea bezeichnet. Je nach betroffenem anatomischen Korrelat wird sie in Iritis/Iridozyklitis (anteriore Uveitis), Zyklitis (intermediäre Uveitis) und Choroiditis (posteriore Uveitis) eingeteilt. Außerdem ist es möglich, dass sich die Entzündung der Iris im weiteren Verlauf auf die Choroidea ausdehnt und umgekehrt. Bei dem Befall der gesamten Uvea spricht man von Panuveitis. Sekundär sind häufig Strukturen wie Netzhaut, Glaskörper, Nervus opticus und Sklera mitbetroffen (Bloch-Michel und Nussenblatt 1987, Küchle und Naumann 1997).

Die Inzidenz der Uveitis beträgt etwa 10-20 / 100.000 Einwohner und Jahr, wobei 52-60% der Fälle einer akuten Uveitis anterior entsprechen (Darrell 1962, Smit 1993, Vadot 1992). In ungefähr 30 % der Uveitisfälle sind die Ursachen nicht klar festzustellen. Entnimmt man diesem Prozentsatz die Fälle, die klinisch eingeordnet werden können, aber ebenfalls eine unbekannte Ätiologie aufweisen (z.B. Heterochromiezyklitis Fuchs), dann erhöht sich dieser Anteil auf nahezu 50 % (Suttorp und Rothova 1996).

Je nach Lokalisation und Ätiologie der Entzündung sowie der immunologischen Situation der Erkrankten, kann die Entzündung der Uvea einen akuten, chronischen oder chronisch-rezidivierenden klinischen Verlauf zeigen.

Die Ursache für eine infektiöse Uveitis sind Bakterien (z.B. Propionibacterium acnes endophthalmitis), Viren (z.B. Herpesviren), Pilze, Protozoen (z.B. Toxoplasma gondii) oder Parasiten (z.B. Toxocara canis). Nichtinfektiöse Ursachen sind z.B. traumatische Augenverletzungen oder maligne Erkrankungen (Maskerade-Syndrome). Gleichfalls zur Gruppe der nichtinfektiösen Uveitiden wird eine primär oder sekundär mit Systemerkrankungen assoziierte Uveitis gezählt. Als Ursache vermutet man eine gleichermaßen gegen das Auge wie auch gegen weitere Organe und Gewebe gerichtete autoimmunologische Reaktion der Betroffenen. Bei einigen Uveitisformen ist die Assoziation mit speziellen Histokompatibilitätsantigenen, z.B. HLA B-27, auffällig. Experimentelle Ergebnisse sprechen für eine Kreuzreaktivität zwischen dem HLA-B27-Peptid und einem retinalen Peptid (Wildner und Thureau 1994).

Besonders bei chronisch-rezidivierenden Uveitisformen sind eine Reihe von Komplikationen bekannt. In Betracht kommen vor allem die Cataracta complicata, das Sekundärglaukom, eine bandförmige Hornhautdegeneration, das zystoide Makulaödem und eine exsudative Netzhautablösung. Diese Sekundärerkrankungen erklären, warum Uveitiden die dritthäufigste Erblindungsursache darstellen (Suttrop und Rothova 1996).

### 1.3 Tiermodelle der nichtinfektiösen Uveitis

Bei nichtinfektiösen Uveitiden ist ein direkter Nachweis ätiopathogenetischer Zusammenhänge bisher nicht möglich. Aus diesem Grund wurden in der Vergangenheit eine große Anzahl Tiermodelle für Uveitiden entwickelt. Sie sollen die Untersuchung der infektiösen (Martenet 1966, Pavan 1968), toxischen oder Mediator-induzierten Genese (Fleisher 1990, Rosenbaum 1980, Rosenbaum 1988, Samples 1993) erlauben.

Eine Hypothese für die Entstehung autoimmuner okulärer Entzündungen geht davon aus, dass eine vorausgegangene Infektion mit Bakterien, Viren oder Parasiten stattgefunden hat. Diese Infektion soll autoimmunologische Prozesse in Gang setzen, die für die Uveitis-Genese verantwortlich sind (Hammer 1990, McMenamin 1993a). Die autoimmunologische Ätiopathogenese versucht man an experimentellen Uveitiden nachzuvollziehen, die durch verschiedenste Immunogene induziert werden können. Elschmig konnte schon 1910 den antigenen Effekt uvealen Pigments nachweisen, indem er Versuchstiere mit uvealem Gewebe immunisierte (Elschnig 1910). 1949 wurde durch Collins ein weiteres Tiermodell vorgestellt, das histologisch vergleichbar mit der sympathischen Ophthalmie war und durch Immunisierung mit homologem uvealem Gewebe in Meerschweinchen auslösbar war (Collins 1949). Im Laufe der Zeit kamen weitere Antigen-induzierte Uveitis-Tiermodelle hinzu, zum Beispiel die „experimentelle autoimmune Uveitis“ (EAU) (Forrester 1990). Sie weist große Ähnlichkeit mit der Uveitis posterior auf. Die EAU kann durch Immunisation verschiedener Tierspezies mit vielfältigen Antigenen der Retina zusammen mit geeigneten Adjuvantien induziert werden. Verwendete uveitogene Substanzen sind zum Beispiel das retinale S-Antigen (S – soluble; ein an der Phototransduktion beteiligtes intrazelluläres Antigen), IRBP (Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein; ein extrazelluläres Matrixprotein, das am Transport von Vitamin-A-Derivaten beteiligt ist), Rhodopsin, PEP-65 (ein aus RPE-Zellen aufgereinigtes Peptid) und Phosducin (McMenamin 1993b). Eine vorwiegend posteriore Uveitis manifestiert sich bei allen EAU-Modellen innerhalb von 10–14 Tagen nach der Immunisation. Die okuläre Symptomatik und histopathologischen Merkmale variieren allerdings beträchtlich, da der Typ der histopathologischen Antwort von einer Reihe von Faktoren abhängig ist: (a) von der Natur des Antigens, (b) von dessen Dosis, (c) vom Administrationsort des Antigens, (d) von der Verwendung spezieller Adjuvantien, (e) von der Tierspezies, (f) von genetisch prädisponierenden Faktoren innerhalb einer Spezies (Caspi 1999, McMenamin 1993a). Bei allen Modellen der EAU ist histologisch eine durch T-Lymphozyten vermittelte Uveitis ähnlich der humanen Uveitis nachweisbar (Forrester 1990).

#### 1.3.1 Experimentelle Melaninprotein-induzierte Uveitis (EMIU)

Die experimentelle Melaninprotein-induzierte Uveitis (EMIU) zeigt durch die Beteiligung von Iris und Ziliarkörper, durch den akuten Verlauf und durch rezidivierende Entzündungsschübe Ähnlichkeiten mit der bei dem M. Behçet, M. Bechterew und dem Vogt-Koyanagi-Harada-Syndrom auftretenden anterioren Uveitis. Diese verhältnismäßig neue Form der experimentellen Uveitis wurde erstmals von Broekhuysen 1991 als „Experimentelle Anteriore Autoimmunuveitis“ (EAAU) beschrieben (Broekhuysen 1991). Broekhuysen injizierte Lewis-Ratten eine Emulsion aus bovinem choroidealem Melaninprotein (BMA), komplettem Freund-Adjuvans (CFA), Pertussistoxin (PTX) und PBS zu einem Teil in die Pfoten und zum anderen Teil intraperitoneal (Broekhuysen 1991, Broekhuysen und Kuhlmann 1993). Später konnte nachgewiesen werden, dass auch aus Rinderhaut gewonnenes Melaninprotein in veränderter Zusammensetzung der Emulsion uveitogen wirkt (Broekhuysen 1993a). Charakteristisch ist das Eintreten entzündlicher Veränderungen primär der Iris und des Ziliarkörpers infolge einer fern vom Auge durchgeführten Immunisation. Selten ist eine inflammatorische Beteiligung der Choroidea zu beobachten. Demgegenüber konnten retinale Läsionen bei der EMIU bisher genauso wenig nachgewiesen werden wie assoziierte Entzündungen von Zirbeldrüse, Meningen oder der Haut (Broekhuysen 1991, Broekhuysen 1992, Broekhuysen 1993b, Broekhuysen und Kuhlmann 1993). Die okuläre Manifestation der Entzündung lässt autoimmunologische Kreuzreaktivität mit dem subkutan oder intraperitoneal zugeführten Immunogen vermuten.

Iris, Ziliarkörper und Choroidea sind melaninhaltige Gewebe. Bei Lewis-Ratten (Albinos) lässt sich kein Pigment (Melanin) in den Geweben der genannten Organe nachweisen, obwohl Melanozyten vorhanden sind. Da die experimentelle autoimmune Uveitis an diesem Stamm sehr gut auslösbar ist und deproteinisiertes Melanin nicht uveitogen wirkt, muss es sich um ein in der Melanozyten-

membran lokalisiertes Immunogen (Broekhuysen 1993b) handeln. Die Aufklärung des Antigens oder der antigenen Domäne des Melaninproteins steht unter anderem aus diesem Grunde im Interesse weiterer Forschung. Bisher konnten mehrere Proteinfractionen isoliert werden, die je nach Menge bzw. verwendeten Adjuvantien vergleichbare Merkmale mit der EMIU zeigen, jedoch im zeitlichen Verlauf und in der Inzidenz von Entzündungszeichen Unterschiede aufweisen (Broekhuysen 1992, Broekhuysen 1996, Woon 1999).

Die EMIU ist eine zellvermittelte okuläre Entzündung. Mittels Adoptivtransfer aktivierter CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten kann eine entsprechende Symptomatik in nichtimmunisierten Tieren erzielt werden (Broekhuysen 1992).

#### **1.4 Therapiemöglichkeiten der Uveitis**

Bei den infektiösen Uveitisformen kann eine spezifische medikamentöse Therapie gezielt eingeleitet werden. Zum Beispiel werden Ganciclovir und Foscarnet zur antiviralen Therapie der Zytomegalie-Chorioretinitis angewandt.

Die Ursachen der nichtinfektiösen Uveitis sind, wie oben erwähnt, in den meisten Fällen unbekannt. Um schwerwiegende Entzündungsfolgen möglichst gering zu halten, muss mit einer unspezifischen antiinflammatorischen Therapie begonnen werden. Im Allgemeinen wird lokal oder systemisch mit antientzündlichen und immunsupprimierenden Substanzen therapiert. Man mindert dadurch die akute Symptomatik und kann der fortschreitenden Visusminderung und anderen sekundären Komplikationen Einhalt gebieten.

Lokale und systemische Kortikosteroide sind bei den meisten nichtinfektiösen Uveitisformen initial Mittel der Wahl. Bei längerer Anwendung von Kortikoiden ist allerdings mit einer großen Anzahl von Nebenwirkungen zu rechnen, wodurch die Applikation von „steroidsparenden“ Substanzen an Bedeutung gewinnt. Dazu gehören Alkylantien (Cyclophosphamid; Chlorambucil), Antimetabolite (Methotrexat) und Nukleosidanaloga (Azathioprin), wie auch die Substanzgruppe der Cyclophiline (Cyclosporin; FK506 – Takrolimus; Rapamycin - Sirolimus). Allerdings weisen auch diese Medikamente eine nicht unerhebliche Toxizität und entsprechende Nebenwirkungen auf (Van Geldern und Kaplan 1999).

Es ist Aufgabe der Grundlagenforschung, die Ätiologie der verschiedenen Uveitisformen zu ergründen. Erst dann wird eine spezifische Therapie möglich. Durch das bisherige Verständnis der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen ergeben sich verschiedene experimentelle Lösungsansätze, die es ermöglichen in einzelne Schritte des Krankheitsprozesses einzugreifen:

-Die Induktion der oralen Toleranz zielt auf die Generation einer spezifisch supprimierenden T-Helfer-Antwort (Nussenblatt 1990, Trentham 1993, Weiner 1993).

-Die Blockade von Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten und Endothel wird durch experimentelle Gabe von monoklonalen Antikörpern gegen Adhäsionsmoleküle erreicht. Damit wird die Migration und Transmigration von Leukozyten in entsprechende Zielgewebe verhindert (Whitcup 1997).

-Durch Blockade von Zytokinrezeptoren auf Leukozyten kann die direkt destruktive Wirkung der Entzündungszellen während einer Entzündungsreaktion verhindert werden (Dick 1996).

-Die intravitreale Immunmodulation könnte eine weitere Möglichkeit sein. Jaffe et al. implantierten z.B. ein Cyclosporin-Pellet als Wirkstoffdepot in den Glaskörper von Kaninchen (Jaffe 1998). Nach Meinung der Autoren soll der Wirkstoff aus dem Implantat über nahezu 10 Jahre kontinuierlich freigesetzt werden. Die Übertragung dieser experimentellen Ergebnisse auf den klinischen Gebrauch steht bisher aus.

-Mit dem Gentransfer durch geeignete Vektoren sind weitere zukunftssträchtige Therapien denkbar. Bisher werden virale und liposomale Vektoren geprüft. Virale Vektoren sind aufgrund der möglichen Induktion einer Immunantwort nicht unbedenklich, obwohl sie bisher eine größere Transfektionsrate und Effizienz der Genexpression zeigen als liposomale Vektoren (Chan 1998, Csaky und Nussenblatt 1999). Ausgereifte klinische Anwendungsmöglichkeiten des Gentransfers existieren bisher noch nicht.

## 1.5 Antigenpräsentierende Zellen im Vorderabschnitt des Auges

In Iris und Ziliarkörper existiert ein hochentwickeltes Netzwerk aus ortsständigen dendritischen Zellen und Makrophagen (Forrester 1993, McMenamin 1994, McMenamin 1999).

Dendritische Zellen gelangen als undifferenzierte Vorstufen aus dem Knochenmark über die Blutzirkulation in okuläres Gewebe. Dort entwickeln sich die Vorläuferzellen über Zellreifungsprozesse zu einer eigenständigen ortsgebundenen Zellpopulation mit antigenpräsentierendem Charakter. Vorläuferzellen dendritischer Zellen besiedeln weitere nicht-lymphatische Gewebe, wie die Epidermis der Haut (Langerhans-Zellen) (Breathnach 1988), die Lunge (Havenith 1992) und das Herz. Neben diesen nicht-lymphatischen Geweben verteilen sich die Vorstufen dendritischer Zellen in den für T-Lymphozyten spezifischen Arealen (T-Regionen) der lymphatischen Organe Milz, Lymphknoten und Thymus. Ein anderer Teil verbleibt in der Blutzirkulation.

In Iris und Ziliarkörper von Ratten konnten dendritische Zellen in einer hohen Dichte von 400 bis 600 Zellen pro mm<sup>2</sup> nachgewiesen werden (McMenamin 1997a). Dendritische Zellen haben entweder die Möglichkeit Antigene lokal immunkompetenten T-Lymphozyten zu präsentieren oder sie migrieren nach Antigenkontakt über Blut und Lymphe zu den T-Regionen lymphatischer Organe. Das Potential eine Immunantwort zu induzieren, ist bei dendritischen Zellen um ein Vielfaches höher als das von Makrophagen, B-Lymphozyten oder Endothelzellen (McMenamin 1992, Steptoe 1995): Ähnlich wie Makrophagen können sich dendritische Zellen aktiv bewegen. Zudem ermöglichen lange Zellfortsätze den Kontakt mit Zellen in einem größeren Umfeld. Dendritische Zellen exprimieren außerdem konstitutionell eine Vielzahl verschiedener Moleküle und Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche (MHC-I- und MHC-II-Moleküle; die Adhäsionsmoleküle LFA-1, LFA-3, ICAM-1/-2 und andere) (Hart und Prickett 1993a, Hart und Prickett 1993b). Diese Moleküle können einerseits einen stärkeren Kontakt zu T-Lymphozyten herstellen, andererseits direkt als Signalmoleküle wirken. Auch Zytokine werden von dendritischen Zellen sezerniert (Avice 1999, Calder 1993, de-Saint 1998, Demeure 2000, Vezzio 1996, Yokota 1996).

Makrophagen stellen eine morphologisch und funktionell heterogene Zellpopulation dar. Als Antigenpräsentierende Zellen, Regulator-Zellen oder Effektor-Zellen sind Makrophagen für die Immunabwehr essentiell (Unanue und Allen 1987).

Die hauptsächliche Aufgabe von Makrophagen ist die Phago- und Pinozytose von Zelltrümmern, Mikroorganismen, Tumorzellen und anderen als „fremd“ erkannten Antigenen. Nach Antigenprozessierung können Fragmente dieser Antigene gegenüber CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in Assoziation mit dem MHC-II-Peptid präsentiert und eine entsprechende Immunantwort eingeleitet werden.

Ferner synthetisieren Makrophagen Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 sowie zytotoxische Substanzen wie Sauerstoffradikale und Nitritoxid wenn sie zuvor durch IFN- $\gamma$ , IL-2, LPS oder MDP stimuliert wurden (van de Loosdrecht 1992). In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass Makrophagen selektiv Tumorzellen abtöten können (Keller 1990, van de Loosdrecht 1993).

Makrophagen sind neben ihrer Effektor-Funktion im Rahmen der Immunabwehr in nahezu alle Entzündungsstadien eingebunden. Als Antwort auf eine Infektion produzieren Makrophagen Substanzen wie IL-1 und TNF- $\alpha$ , die proinflammatorisch wirken (Dinarello 1989b). Nach Abklingen der Entzündungsreaktion unterstützen Makrophagen Wundheilungsprozesse, wie beispielsweise durch die Sekretion von TGF- $\beta$  (Pierce 1989), das die Kollagensynthese von Fibroblasten fördert.

In okulärem Gewebe - insbesondere in Ziliarkörper und Iris - ist neben dendritischen Zellen das perivaskuläre Vorkommen ortsständiger Makrophagen in relativ gleichmäßiger Dichte von ca. 600 – 800 Zellen pro mm<sup>2</sup> auffällig (McMenamin 1997a).

## 1.6 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass die Akkumulation von Leukozyten in entzündlichem Gewebe in einem speziellen Interaktionsmuster zwischen Leukozyten und Endothel erfolgt (Carlos und Harlan 1994, Harlan 1985, Springer 1994). Zirkulierende Leukozyten müssen die Blutgefäße verlassen, um zum Entzündungsort zu gelangen. Die transendotheliale Migration von Leukozyten läßt intravitalmikroskopisch mehrere, sich teils überschneidende Stadien der Adhäsion erkennen.

### Intravitalmikroskopisch nachweisbare Adhärenzphänomene (Abb.1, A)

Als erster Schritt kann nach zufälligem Kontakt zwischen Leukozyten und Endothel ein „Rollens“ der Leukozyten entlang der inneren Gefäßwand von Venolen beobachtet werden. Das Rollen von Leukozyten am Gefäßendothel setzt einen physiologischen Blutstrom voraus. Das Phänomen des Rollens ist das Resultat von auf Leukozyten wirkenden Scherkräften des Blutstroms und der durch Adhäsionsmoleküle vermittelten Adhärenz zwischen Leukozyten und Endothel. Als passiver Vorgang kann das Rollen entsprechend bei intravasaler Blutstase nicht beobachtet werden. Das Rollen von Leukozyten entlang der luminalen Gefäßwand kann sowohl als Reaktion auf Gewebstraumata und Entzündungen als auch unter physiologischen Bedingungen beobachtet werden (Baatz 1995, Mayrovitz 1992).

Als weitere Reaktion auf Traumata oder Entzündungsreize beginnt ein Teil der rollenden Leukozyten fest am Gefäßendothel zu adhären. Zusammen mit anderen Leukozyten können sich regelrechte Zellaggregate ausbilden. Bei weiterbestehendem Reiz durchwandern Leukozyten das Gefäßendothel und migrieren aus dem subendothelialen Raum zum Entzündungsort.

Die mikroskopisch sichtbaren Stadien der Leukozyten-Endothel-Interaktion werden auf molekularer Ebene durch verschiedene Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen und Leukozyten vermittelt. Ferner haben Zytokine, Chemokine etc. unterschiedlichen Ursprungs einen aktivierenden Einfluß.

### Molekulare Mechanismen (Abb.1, B)

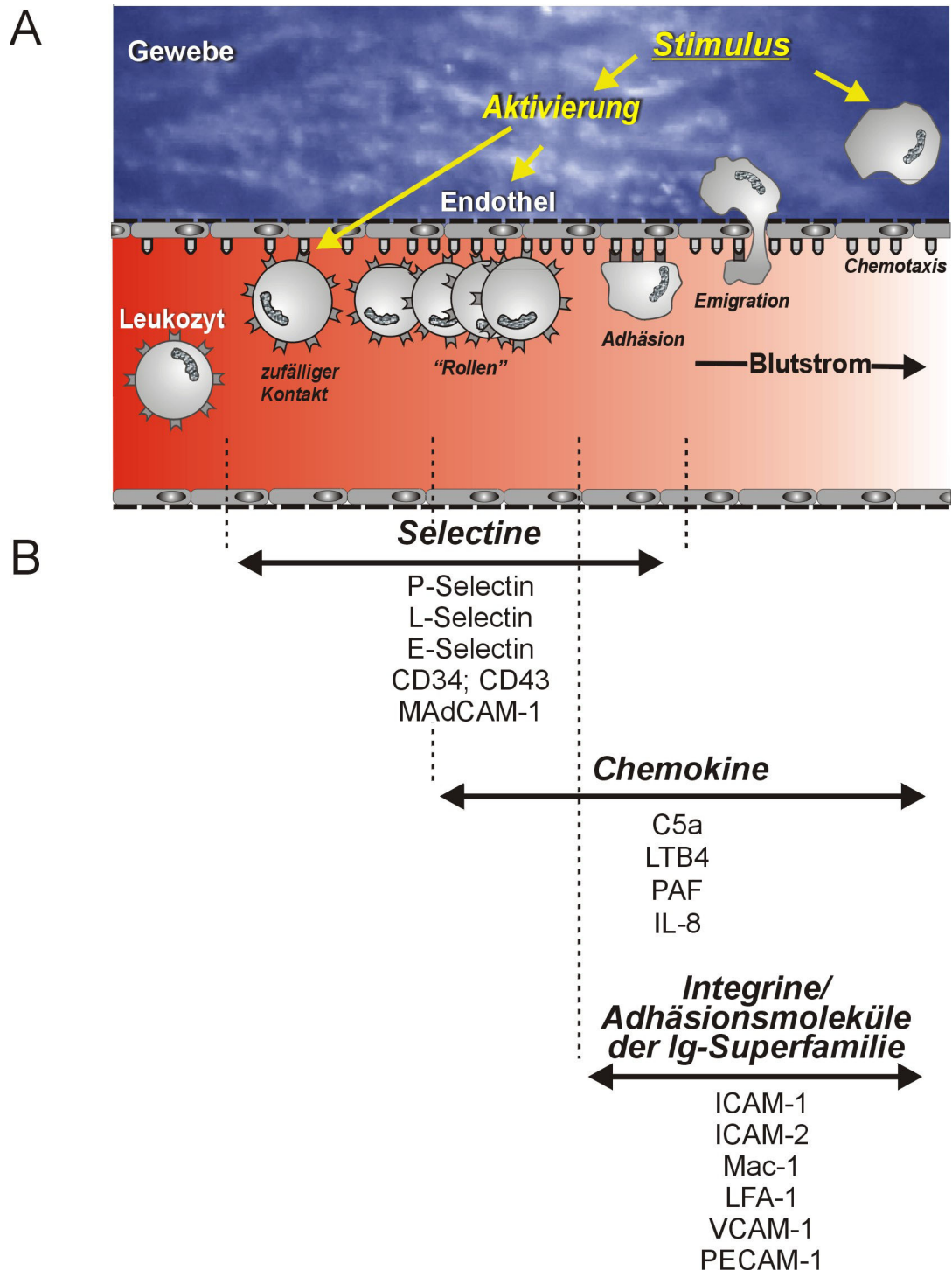
Das kurzzeitige Haften von Leukozyten (für Millisekunden) und das „Rollens“ der Leukozyten an der inneren Gefäßwand wird durch Adhäsionsmoleküle der Selectin-Familie vermittelt (Konstantopoulos und McIntire 1997, Lawrence und Springer 1991, Ley 1991, Mayadas 1993, von Andrian 1993). L-Selectin ist auf fast allen zirkulierenden Leukozyten nachweisbar (Carlos und Harlan 1994). P-Selectin, das in Granula der Weibel-Palade-Körper von Endothelzellen und in  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten gespeichert wird, kann als Antwort auf inflammatorische Stimuli (Thrombin, Histamin) rasch in die Zellmembran verlagert werden (Carlos und Harlan 1994). Die Expression von E-Selectin auf Endothelzellen wird durch die von Zytokinen (IL-1 oder TNF) induzierte de novo mRNA- und Protein-Synthese ermöglicht (Carlos und Harlan 1994). Selectine erkennen Karbohydratdeterminanten (Sialyl Lewis X; Sialyl Lewis A) und glykosylierte muzinähnliche Moleküle (GlyCAM-1; CD34; ESL-1; PSGL-1; MAdCAM-1) (Baumhüter 1993, Berg 1993, Lasky 1992, Moore 1992) als Komplementärrezeptoren.

In der zweiten Phase der Leukozytenrekrutierung („sticking“) werden bei Überwiegen proadhäsiver Faktoren Leukozytenintegrine (z.B. LFA-1 und Mac-1) aktiviert und endotheliale Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie (z.B. ICAM's) exprimiert. Integrine sind eine Klasse von Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten, die in aktivierter Form die stabile Adhäsion an endothelialen Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1 und VCAM-1) ermöglichen (Carlos und Harlan 1994). Die de novo Synthese endothelialer Adhäsionsmoleküle wird durch Zytokine wie z.B. TNF- $\alpha$ , IL-1, IFN- $\gamma$ , IL-4 induziert (Carlos und Harlan 1994). Es sind mehrere Mechanismen der Aktivierung von Leukozytenintegrinen bekannt. Sie haben Konformationsänderungen der Integrinstruktur zur Folge (Carlos und Harlan 1994), woraus eine gesteigerte Affinität der Integrine zu den entsprechenden Liganden des Endothels resultiert: Die Bindung von Chemokinen (z.B. IL-8, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , Zytokinen (z.B. GM-CSF, IL-5) oder Chemoattractanten (z.B. C5a, FMLP) an Rezeptoren der Leukozyten ist ein die Adhäsion verstärkendes Signal. Diese aktivierenden Substanzen entstammen entweder dem entzündeten Gewebe oder werden von infiltrierenden Leukozyten, Mikroorganismen und dem Endothel selbst sezerniert. Darüber hinaus werden Leukozytenintegrine (z.B. LFA-1, MAC-1) durch Kontakt mit Komplementärstrukturen (z.B. CD2, CD3, CD43, CD44) auf der Oberfläche anderer Leukozyten aktiviert. Weiterhin wirkt die Bindung von Leukozyten an endotheliale Adhäsionsmoleküle aktivitäts- und affinitätsfördernd.

Im weiteren Verlauf der Leukozyten-Endothel-Interaktion verlassen Leukozyten durch Interzellularspalten des vaskulären Endothels das Gefäßlumen und dringen in das subendotheliale Gewebe ein. Viele in vitro und in vivo durchgeführte Studien untersuchten das Phänomen der leukozytären Transmigration. Zur Anwendung kamen einzelne oder miteinander kombinierte monoklonale Antikörper, um selektiv Adhäsionsmoleküle auf Endothel und Leukozyten zu blockieren. Es zeigte sich, dass die selektive Blockade leukozytärer und/oder endothelialer Adhäsionsmoleküle eine Inhibition der Transmigration bzw. die Rekrutierung leukozytärer Subpopulationen (Lymphozyten, Neutrophile, Monozyten etc.) zur Folge hat. Daneben wurde der Einfluss von Zytokinen, Chemokinen,



Chemoattractanten etc. auf die Transmigration überprüft. Diese Substanzen haben, wie erwähnt, eine vielfältige Wirkung auf die Aktivierung bzw. Expression von Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten und Endothel. Als Konsequenz ist eine selektive Rekrutierung leukozytärer Subtypen möglich (Springer 1994).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Leukozyten-Endothel-Interaktion. **[A]** Mit Intravitalmikroskopie nachweisbare Adhärenzphänomene der Leukozyten am vaskulären Endothel. **[B]** Molekulare Grundlagen der Adhäsion und Transmigration von Leukozyten in perivaskuläres Gewebe - Adhäsionsmoleküle und Chemokine.

Abkürzungen: MAdCAM - mucosal addressin cell adhesion molecule; ICAM - intercellular adhesion molecule; Mac-1 - macrophage-1-antigen; LFA - lymphocyte function-associated antigen; VCAM - vascular cell adhesion molecule; PECAM - platelet-endothelial cell adhesion molecule; LTB4 - Leukotrien B4; PAF - platelet activating factor

## 1.7 Intravitalmikroskopie

Eine der wichtigsten Untersuchungsmethoden zur Beobachtung physiologischer und pathophysiologischer Vorgänge in der Endstrombahn stellt die Intravitalmikroskopie dar (Menger und Lehr 1993). Lange Zeit beschränkten sich Untersuchungen der Mikrozirkulation auf das Mesenterium, die Hamsterbackentasche oder auf das Kaninchenohr (Illig und Conraths 1958). Morphologische Untersuchungen des Auges fanden nur mit Hilfe von Spaltlampe oder Ophthalmoskop statt. 1960 gelang es Bensley erstmalig vitalmikroskopische Beobachtungen speziell am albinotischen Mäuseauge mittels Quarzstabilluminator durchzuführen (Bensley 1960). Die von Bensley beschriebene Methode hatte allerdings eine Verlagerung des Mäuseauges in Exophthalmusstellung zur Voraussetzung, was unphysiologische Veränderungen der Mikrozirkulation am Auge mit sich führt. Ende der sechziger Jahre führte Castenholz vitalmikroskopische Untersuchungen am vorderen Bulbusabschnitt albinotischer Nager mit verbesserter mikroskopischer Apparatur und im Auflicht durch (Castenholz 1966). Aufgrund der Pigmentlosigkeit der Augenhäute albinotischer Nager liegen günstige Voraussetzungen für mikroskopische Untersuchungen in vivo vor. Ein Vorteil der durch Castenholz etablierten Methode besteht darin, dass unter völlig physiologischen Voraussetzungen durch das Hornhautfenster hindurch die Mikrostrombahn im vorderen Augenabschnitt beobachtet werden kann. Traumatische Läsionen durch Präparation, unphysiologische kolloidosmotische Faktoren oder Temperaturveränderungen werden vermieden. Ein weiterer Vorzug der erwähnten Methode ist durch die fast beliebige Wiederholbarkeit gegeben. Somit können Langzeituntersuchungen an interessierenden Gefäßabschnitten durchgeführt werden. Mit dem Fortschreiten technologischer Möglichkeiten, die eine Verbesserung der Bildqualität, Bildverarbeitung und -analyse mit sich brachten, gewann diese Methode weiter an Bedeutung. Zusätzlich fanden Fluorochrome Anwendung, die spezifisch Leukozyten beziehungsweise Erythrozyten anfärben, womit weiter differenzierende Untersuchungen der Mikrostrombahn mittels Fluoreszenzintravitalmikroskopie möglich wurden. Damit konnten bei experimenteller intraokulärer Entzündung Adhärenzphänomene von Leukozyten am Gefäßendothel und die Transmigration von Leukozyten in perivaskuläres Gewebe beobachtet und quantifiziert werden (Baatz 1995).

## 1.8 Clodronat

Clodronat (Ostac®, Bonefos®) gehört zu einer Medikamentengruppe, den Bisphosphonaten, die in den letzten 25 Jahren vorrangig für diagnostische und therapeutische Zwecke bei verschiedenen Knochen- und Kalziumstoffwechselkrankheiten entwickelt wurden (Fleisch 1988, Fleisch 1997). Als erster Vertreter wurde die Etidronsäure hergestellt und mit Erfolg bei der Behandlung des M. Paget eingesetzt. Erst die Entwicklung neuerer, potenterer und vor allem intravenös applizierbarer Bisphosphonate ermöglichte eine breite Anwendung dieser Substanzgruppe. Heute werden Bisphosphonate therapeutisch bei dem M. Paget des Knochens, bei Knochenmetastasen (Mamma-, Prostatakarzinom) und bei dem Multiplen Myelom eingesetzt (Bartl und Williams 1997, Hurst und Noble 1999, Pelger 1998).

Für weitere Forschungsgebiete erscheint aus der Substanzgruppe der Biphosphonate insbesondere das Clodronat interessant. Zur Modulation der Immunantwort durch Makrophagendepletion wird Clodronat experimentell auf dem Gebiet der Herz-, Lungen- und Hornhauttransplantation angewandt (Shane 1998, Torres 1999, van der Veen 1994, van Rooijen 1989a). In Liposomen verkapselt wird Clodronat von Makrophagen aufgenommen und daraufhin die Apoptose dieser Zellen eingeleitet. Die genauen Mechanismen sind derzeit noch unklar. Andere phagozytierende Zellen, wie T-Zellen, Neutrophile und Endothelzellen, sind gegenüber dem zytotoxischen Effekt des Clodronats unempfindlich (Schmidt-Weber 1996).

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Tiere**

In dieser Studie dienten weibliche Lewisratten (n=82) als Versuchstiere. Sie wurden von der Charles River Deutschland GmbH Sulzfeld bezogen. Bei Versuchsbeginn wogen die Ratten zwischen 180 und 210 g und wurden in einem 12-stündigen Hell-dunkel-Zyklus in Standardkäfigen des Typs III aus Makrolon (Polycarbonat) zu maximal 2 Tieren gehalten. Die Tiere erhielten Standardfutter und Wasser ad libitum.

Alle Experimente richteten sich nach den gesetzlichen Bestimmungen des deutschen Tierschutzes und der ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) für das Verwenden von Tieren in der augenheilkundlichen Forschung und der Forschung auf dem Gebiet des visuellen Systems.

### **2.2 Antigenpräparation**

Melanin-assoziiertes Antigen wurde hergestellt wie erstmalig durch Broekhuysen et al. beschrieben (Broekhuysen und Kuhlmann 1993). Für die Gewinnung des Melaninproteins wurden Rinderaugen aus einem Schlachthof verwendet. Den innerhalb von 5 Stunden gelieferten Rinderaugen wurde das vordere Segment entfernt, zusätzlich auch das Corpus vitreum und die Retina. Das hintere Segment wurde mit PBS (pH=7,4) gespült, um daraufhin die Choroidea mit anhängendem RPE vorsichtig mit Pinzetten zu entfernen. Die Choroidea wurde unter geringer Zugabe von destilliertem Wasser in einem Mörser zerrieben und die entstandene Suspension so oft durch Gaze filtriert, bis sich das choroideale Gewebe grau färbte. Bei 10.000 g und 4 °C wurde das Filtrat 10 Minuten zentrifugiert (Labofuge 400R, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland), das Sediment mit PBS gewaschen, in 2%ige SDS-Lösung (Sodeumdodecylsulfat) gegeben und für 10 Minuten im Wasserbad auf 75 °C erhitzt. Anschließend folgte ein weiterer Waschgang, um Reste des SDS zu entfernen. Das Pellet wurde getrocknet (Vakuumzentrifuge Speed Vac® Plus SC 110A, Savant; Kältefalle Refrigerated Vapor Trap RVT400, Savant; Vakuumpumpe BZ43+, Pfeiffer-Balzars, Aslar, Deutschland) und bei -80 °C für weitere Verwendung gelagert.

### **2.3 Vorversuche**

#### **2.3.1 Dosisfindung des uveitogenen Melaninproteins**

Um die zur Auslösung einer Uveitis nötige Menge an bovinem Melanin-assoziiertem Antigen (BMA) festzustellen, wurden 25 µg beziehungsweise 250 µg Melanin-assoziiertes Antigen in Emulsion jeweils 5 Tieren zweier Testgruppen intraperitoneal verabreicht. Die Emulsion mit einem Gesamtvolumen von 500 µl enthielt 250 µl komplettes Freund-Adjuvans (CFA, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) sowie zusätzlich 1 µg Pertussistoxin (PTX, Gibco Life Technologies™, U.S.A.). Untersuchungen des Augenvorderabschnittes wurden ab dem 7. Tag bis zum 21.Tag post immunisationem (p.i.) mittels Spaltlampe (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere getötet.

Alle Injektionen wurden unter Etheranästhesie (Asid Bonz GmbH, Böblingen, Deutschland) durchgeführt.

#### **2.3.2 Induktion der EMIU ohne Adjuvantien**

Komplettes Freund-Adjuvans (CFA, bestehend aus Mineralöl und abgetöteten Tuberkulose-Mykobakterien) und Pertussistoxin (PTX) werden bei Entzündungsmodellen als Immunadjuvantien verwendet. Sie enthalten Substanzen, die die Immunantwort qualitativ und quantitativ modulieren. Kostimulatorische Signale werden durch CFA verstärkt, während PTX unspezifisch Lymphozyten stimuliert (McAllister 1986, Munoz 1988).

Nach Bora ist die experimentelle Melanin-induzierte Uveitis auch ohne Einsatz von komplettem Freund-Adjuvans und Pertussistoxin auslösbar. Variable systemische Effekte der Adjuvantien können dadurch ausgeschlossen werden (Bora 1997).

An einer Gruppe von 6 Ratten wurde versucht, eine Uveitis ohne den Einsatz von CFA und PTX zu induzieren. Dazu wurden 250 µg Melanin-assoziiertes Antigen in 500 µl 0,9%iger Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert und ab dem 8. Tag bis zum 21.Tag p.i. täglich mittels Spaltlampenmikroskopie auf Hinweise einer sich entwickelnden Uveitis untersucht. Die Tiere wurden anschließend getötet.

### **2.4 Induktion der EMIU**

Protokoll I: Den Tieren (n=24) wurde jeweils eine intraperitoneale Injektion von 250 µg bovinem Melanin-assoziierten Antigen in 500 µl einer Emulsion verabreicht, die im Mischungsverhältnis von 1:1 PBS und komplettes Freund-Adjuvans enthielt, sowie zusätzlich 1 µg Pertussistoxin in 10 µl 0,9%iger Kochsalzlösung. Hierzu wurden vier Gruppen jeweils am 4., 6., 8. bzw. 10. Tag intravital-

mikroskopisch untersucht [Abb. 3].

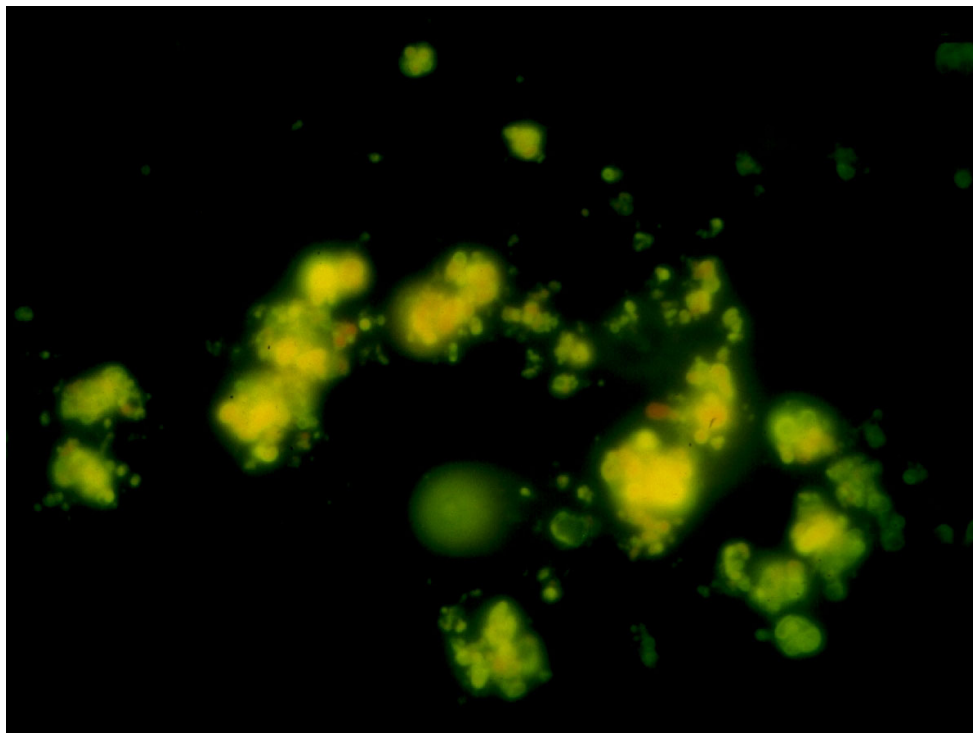
## 2.5 Makrophagendepletion bei EMIU mit liposomal verkapseltem Clodronat

*Protokoll III:* Zwei mit Melaninprotein immunisierte Tiergruppen (n=12) wurden mit liposomalem Clodronat (Clodronat-lip) behandelt. Den Tieren der ersten Gruppe wurde an den Tagen -2; 1; 4; 6 je 2 ml Clodronat-lip intraperitoneal injiziert. Am 8. Tag folgte die intravitalmikroskopische Untersuchung. Die Tiere der zweiten Gruppe wurden an den Tagen -2; 1; 4; 6; 8 mit je 2 ml Clodronat-lip behandelt. Am 10. Tag schloss sich die intravitalmikroskopische Untersuchung an [Abb. 3].

### 2.5.1 Liposomenherstellung

Die Präparation multilamellarer Liposomen richtete sich nach der Beschreibung von van Rooijen et al. (van Rooijen und Sanders 1994).

In einem Rundkolben wurden 75 mg Phosphatidylcholin (Lipoid E PC, Lipoid KG, Ludwigshafen, Deutschland) und 11 mg Cholesterol (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe, Deutschland) in 10 ml Chloroform (Carl Roth GmbH + Co., Karlsruhe, Deutschland) gelöst und mittels eines Vakuum-evaporationssystems (Pumpeinheit PC510, Vacubrand GmbH + Co., Wertheim, Deutschland; Wasserbad B480 und Rotationsevaporator R-124, Büchi Labortechnik AG, Flävil, Schweiz) bei 37 °C getrocknet. Durch Rotation des Rundkolbens während des Trocknungsvorgangs bildet sich an der Innenwand des Kolbens eine dünne Lipidschicht. Nach der Zugabe von 2,5 g Cl<sub>2</sub>MBP (Dichloromethyldiphosphonat, Clodronat, Boehringer, Mannheim, Deutschland) gelöst in 10 ml PBS wurde dieser Lipidfilm für 10 Minuten bei Raumtemperatur zu Liposomen dispergiert. Nach ein- bis zweistündiger Lagerung bei Raumtemperatur wurde die Dispersion in einem Sonicator (Ultraschall-Desintegrator „Sonifier 250“, Branson Ultrasonics Corporation, U.S.A.) bei 50 Hz für 3 Minuten beschallt und abermals für ein bis zwei Stunden gelagert. In der Suspension enthaltenes freies Clodronat wurde durch ein bis zwei Waschgänge entfernt. Die Suspension wurde dazu für 30 Minuten bei 100.000 g und +4 °C zentrifugiert (Sorvall® Combi Plus, Beckmanrotor 45 TI), der Überstand abpipettiert und der Vorgang unter Zugabe von 10 ml PBS erneut durchgeführt. Im Anschluss an den letzten Zentrifugationsschritt und die Entfernung des Überstandes wurden die Liposomen in 4 ml PBS resuspendiert. Die fertige Suspension enthielt circa 10 mg/ml CL<sub>2</sub>MDP.



**Abbildung 2:** Fluoreszierende Liposomen. Fluoreszenzfarbstoff: Rhodamin 6G.

Leerliposomen wurden nach gleicher Art und Weise ohne Clodronatzugabe und ohne anschließende Waschgänge hergestellt. Bis zur weiteren Verwendung der jeweiligen Suspension wurden die Liposomen für maximal 2 bis 3 Tage bei einer Temperatur von +4 °C gelagert. Die Morphologie und Größe der Liposomen wurde stichprobenweise durch Elektronenmikroskopie oder Fluoreszenzmikroskopie nach Anfärbung mit Rhodamin 6G kontrolliert [Abb. 2].

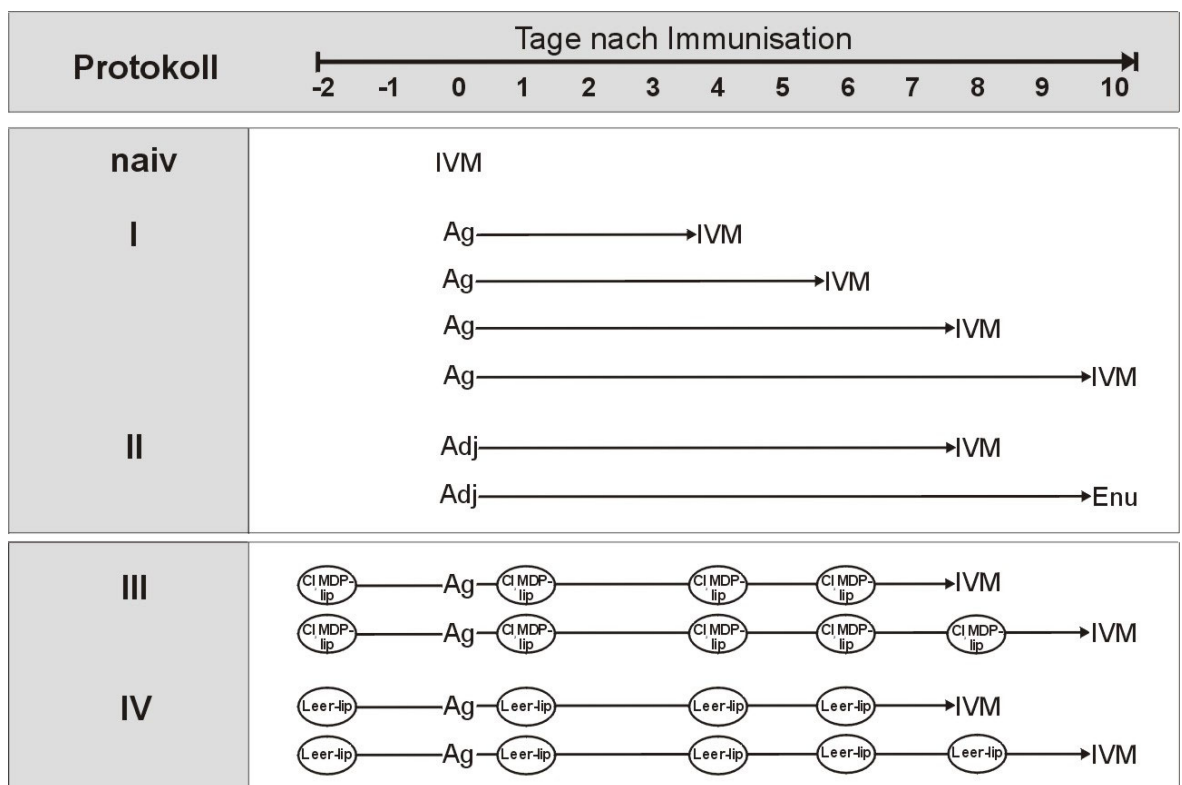
## 2.6 Kontrollen

Fünf Tiergruppen dienten zur Kontrolle [Abb. 3], um mögliche Einflüsse der Adjuvantien Pertussis-toxin, komplettes Freund-Adjuvans oder der Liposomenbestandteile auf die Entzündungsreaktion auszuschließen:

**Protokoll II:** Zwei Gruppen erhielten je Tier (n=12) eine Menge von 500 µl Emulsion aus PBS und CFA im Mischungsverhältnis von 1:1 zusammen mit 1 µg PTX in 10 µl 0,9%iger Kochsalzlösung ohne Melanin-assoziiertem Antigen. Am 8. Tag nach der Immunisation wurden die Tiere der ersten Gruppe intravitalmikroskopisch untersucht. Die Augenvorderabschnitte der zweiten Gruppe wurden am 10. Tag mittels Spaltlampe begutachtet und die Augen nach Tötung der Tiere enukleiert.

**Protokoll IV:** Weiteren zwei Gruppen wurden je Tier (n=12) 250 µg Melanin-assoziiertes Antigen in 500 µl einer Emulsion aus PBS und CFA (Mischungsverhältnis 1:1) sowie 1 µg PTX injiziert. An den Tagen -2, 1, 4, 6 wurden den Tieren der ersten Gruppe 2 ml Leer-Liposomen intraperitoneal appliziert. Am 8. Tag folgte bei dieser Kontrollgruppe die intravitalmikroskopische Untersuchung. Die Tiere der zweiten Gruppe wurden an den Tagen -2, 1, 4, 6, 8 mit je 2 ml Leer-Liposomen behandelt. Die vitalmikroskopische Untersuchung schloß sich am 10. Tag an.

Für Basalwerte der Leukozyten-Endothel-Interaktion wurde eine weitere Tiergruppe (n=6) im naiven Zustand intravitalmikroskopisch untersucht. Entsprechend wurden diese Tiere weder immunisiert noch behandelt.



**Abbildung 3:** Schema für Immunisation und Behandlung der Tiere.

Ag - Melanin-assoziiertes Antigen; Adj - Adjuvantien ohne Antigen; IVM – Intravitalfluoreszenzmikroskopie; Enu - ENUkulation; Cl<sub>2</sub>MDP-lip - Dichlormethylendiphosphonat-Liposomen; Leer-lip - Leer-Liposomen

## 2.7 Intravital-Fluoreszenz-Mikroskopie

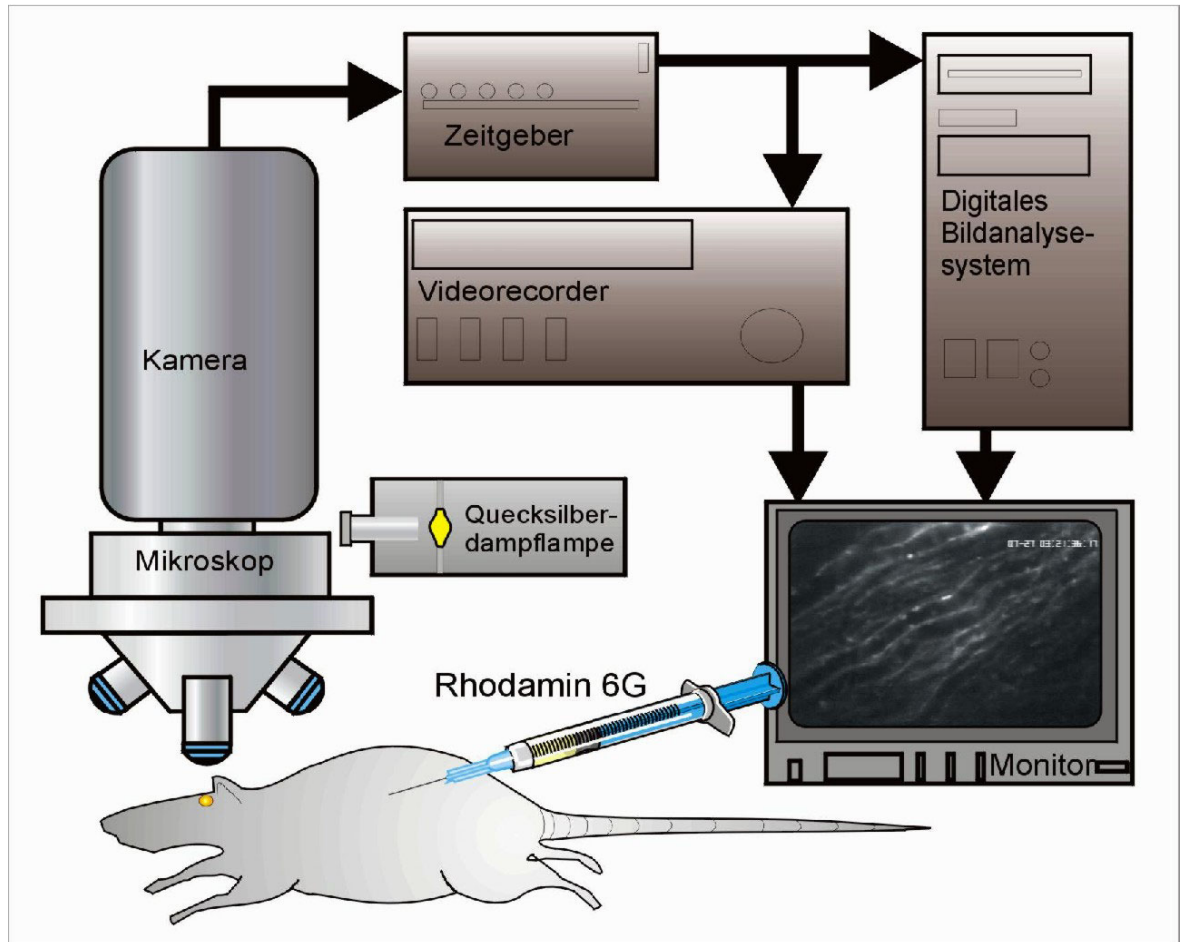
Die Intravitalmikroskopie wurde durchgeführt, wie von Baatz et al. (Baatz 1995) beschrieben.

Zuerst wurden die Tiere mit Nembutal (Pentobarbital 45 mg/kg Körpergewicht, Sanofi Ceva) anästhesiert und ein 0,28 x 0,61 mm Katheter (Portex™, Sims, Kent, U.K.) in die zuvor präparierte Schwanzarterie eingeführt, um eine kontinuierliche Blutdruckmessung sowie die Zuführung von Rhodamin 6G zu gewährleisten. Der gemessene Blutdruck wurde digital gespeichert (a/d i/o board AX 5411, Axiom Technology Co, Ltd, Taiwan) und anhand eines Computerprogramms für digitale Datenanalyse ausgewertet. Tiere mit einem arteriellen Mitteldruck über 120 mmHg beziehungsweise unter 80 mmHg wurden nicht in die Studie eingeschlossen.

Das linke Auge der Tiere wurde mit einem Lokalanästhetikum (Novesine™, Dispersa, Gemering, Deutschland) behandelt. Durch die Applikation eines klaren Gels (Vidisc Gel™; Dr. Mann Pharma,

Berlin, Deutschland) konnte der Austrocknung der Hornhaut während der Intravitalmikroskopie vorgebeugt und gleichzeitig guter Kontakt zwischen Kornea und Objektiv hergestellt werden.

Die Tiere wurden zum Mikroskopieren der Irisgefäße mit dem linken Auge unter dem 20x-Objektiv (Achromplan™ 20 X 0,5w, Zeiss) eines Mikroskops (Axiotech™, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) positioniert.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur intravitalmikroskopischen Darstellung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion am Auge: Die narkotisierten Tiere erhalten intravasal geeignete Fluoreszenzfarbstoffe (z.B. Rhodamin 6G) zur selektiven Darstellung der Leukozyten. Nachdem die Tiere unter dem Objektiv des Mikroskops positioniert wurden, können durch eine zusätzlich installierte CCD-Kamera Bildsequenzen auf einem SVHS-Videorecorder gespeichert werden. Die Auswertung erfolgt über ein System zur digitalen Bildanalyse. Weitere Einzelheiten siehe Text.

Für die Auflichtfluoreszenzmikroskopie wurde eine Quecksilberdampfampe (HBO 100/W2 AttoArc, Zeiss) und ein Zeiss-15-Filterblock (Anregung 534-558, Emission >590nm) verwendet. Mit einer am Mikroskop installierten Videokamera (Pieper FK 6990 IQ, Pieper GmbH, Schwerte, Deutschland) wurden Einzelbilder aufgenommen und zur weiteren Bearbeitung mit Hilfe eines Videorecorders (Sony SVO 9500MDP S-VHS, Sony, Tokyo, Japan) auf Band gespeichert. Ein Zeitgeber (VTG-33, For-A-Company, Tokyo, Japan) blendete während der Aufnahmen ein Zeitsignal auf dem Bildschirm (PVM-2053MD, Sony, Tokyo, Japan) ein. Mit dieser technischen Ausrüstung betrug die Vergrößerung auf dem Monitor x850 [Abb.4].

Die Leukozyten der Versuchstiere wurden *in vivo* durch intraarterielle Bolusgabe von Rhodamin 6G (0,018%, 1ml/kg Körpergewicht, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gefärbt. Mindestens 3 Irisvenolen aus jeweils allen vier Quadranten des linken Auges eines jeden Tieres wurden untersucht. Die Gefäßdurchmesser lagen dabei zwischen 20 und 60 µm. Videobilder von allen 12 Venolen wurden für 30 Sekunden aufgenommen, um off-line eine quantitative Analyse der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion durchführen zu können. Entsprechend der Gruppengröße von n=6 Versuchstieren wurden insgesamt 72 Irisgefäße je Gruppe ausgewertet.



## 2.8 Videosequenzanalyse

Die auf Video gespeicherten Bildsequenzen wurden digitalisiert und unter Verwendung eines Computersystems zur digitalen Bildanalyse (Pentium™ 90 MHz, frame grabber: ITEX IC-VL, Imaging Technology Inc., Bedford, MA, U.S.A.) ausgewertet.

Der Leukozytenflux je Gefäß wurde durch Zählung aller Leukozyten, die eine durch das Gefäß gesetzte Linie innerhalb von 20 s passierten, bestimmt.

Leukozyten, die während des Zeitraumes von 20 s an der inneren Gefäßwand eines 200 µm messenden Gefäßabschnittes hafteten und sich dabei nicht fortbewegten, wurden als fest adhärente Zellen definiert und gezählt. Die Zahl der fest adhärenen Zellen wurde auf die jeweilige Endothelfläche bezogen:

$$\frac{\text{Zahl der adhärenen Zellen}}{\text{Länge des Gefäßabschnittes} \times \text{Gefäßdurchmesser} \times \pi}$$

Rollende Leukozyten stellten diejenigen Zellen dar, welche sich im Randstrom wesentlich langsamer als Leukozyten im Mittelstrom des festgelegten Gefäßsegments bewegten und dabei kurzzeitig mit der Gefäßwand interagierten. Rollende Leukozyten wurden im Verlauf von 20 s an einer durch den betreffenden Gefäßabschnitt gesetzten Linie gezählt.

## 2.9 Blut-/Plasmaanalyse

Nach Ablauf der Intravitalmikroskopie wurden mittels Herzpunktion jedem Versuchstier zwei Blutproben entnommen. Eine der Proben wurde einer automatischen Zellanalyse (Technicon H\*1-System) unterzogen, die andere bei 3.000 g zur Plasmagewinnung zentrifugiert (Labofuge 400R, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland). Das Plasma wurde zu Proben a 120 µl aliquotiert und bei -20 °C gelagert, um zu einem späteren Zeitpunkt die Messung der Zytokine IFN-γ (Cytoscreen™ Immunoassay Kit, Rat IFN-γ, BioSource International, Camarillo, U.S.A.) und TNF-α (Rat TNF-α-ELISA-Kit, Diaclone, Besançon, Frankreich) durchführen zu können.

## 2.10 Kammerwasseranalyse

Die anästhesierten Tiere wurden durch Ausbluten getötet und beide Augen enukleiert. Anschließend wurde die Kornea mit einer 30 g Nadel vorsichtig punktiert, um jegliche Verletzung der Iris beziehungsweise der Linsenkapsel zu vermeiden und ca. 12 µl Kammerwasser aspiriert. Von jedem Auge wurde zweimal 1 µl des entnommenen Kammerwassers mit einer Pipette auf einen mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger aufgebracht, luftgetrocknet und 15 Sekunden mit Wright-Färbung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) behandelt. Vor einem weiteren Trocknungsvorgang wurden Reste der Färbelösung vorsichtig mit destilliertem Wasser von dem Objektträger gespült. Die Zellen wurden unter einem Mikroskop (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) gezählt und aus beiden Zählungen der Mittelwert gebildet.

Das restliche Material wurde bei -20 °C gelagert und zu einem späteren Zeitraum der Proteingehalt nach der Methode von Lowry (D<sub>C</sub> Protein Assay, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) photometrisch im ELISA-Reader bestimmt (Microplate Reader Model 550, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland).

## 2.11 Immunohistologie der Milz

Zum Nachweis der Makrophagendepletion wurde die Milz nach Tötung der Tiere entnommen, in gepuffertem 4%igen Paraformaldehyd fixiert und bei +4 °C gelagert. Das Auswaschen von Paraformaldehyd, die Entwässerung in Alkoholreihen aufsteigender Konzentration und die Einbettung der Organe in Paraffin erfolgte automatisch (Leica TP1020, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland). Am Mikrotom (Jung HN40, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) wurden Paraffinschnitte von 4 µm Stärke angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die Präparate wurden anschließend in Xylol- und Alkoholbädern absteigender Konzentration entparaffiniert und danach für kurze Zeit in TBS gebadet. Die indirekte Peroxidase-Methode (Biotin-Avidin) wurde zur immunhistochemischen Färbung der Paraffinschnitte angewandt. Zuvor wurde die starke endogene Peroxidaseaktivität der Milz mit zwei Verfahren blockiert, um die sonst sehr ausgeprägte Hintergrundfärbung der Präparate zu vermeiden: Die Objektträger wurden in einer Lösung aus 100 % Ethanol und konzentrierter Salzsäure (500:1) und nachfolgend in einer Lösung aus Methanol und 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4:1) für jeweils 20 Minuten gebadet und anschließend mit TBS gespült.

Für die eigentliche Immunhistochemie wurde der Dako Ark™-Peroxidase-Kit (DAKO Corp., Carpinteria, CA, U.S.A.) genutzt, der zur Identifikation primärer Maus-Antikörper auf Rattengewebe geeignet ist. Für die Detektion der Makrophagen wurde der monoklonale Maus-Antikörper ED1 (Chemicon, Temecula, CA, U.S.A.) verwendet. Dieser Antikörper ist gegen ein 90-100 kD großes Glycoprotein gerichtet, das intrazellulär überwiegend von Histiozyten exprimiert wird und daher als

panspezifischer Marker für Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen dient (Dijkstra 1985). Zum Schluß wurden die Präparate mit Hematoxylin gegengefärbt und eingebettet.

## **2.12 Software**

Die während der Experimente digital gespeicherten Blutdruckwerte wurden mit dem Programm Turbolab™ (Bressner Technology, Gröbenzell, Deutschland) ausgewertet.

Die digitale Bildanalyse der Videos erfolgte unter Verwendung der Software Optimas™ (Version 5.2, Optimas Corporation, Bothell, WA, U.S.A.).

Die statistische Prüfung der gewonnenen Daten ermöglichte das Computerprogramm SigmaStat™.

Zum Anfertigen dieses Dokuments wurde das Schreibprogramm Word™ genutzt, alle erhobene Daten in Excel™ (Microsoft Corporation, Redmond, WA, U.S.A.) verarbeitet und damit die hier abgebildeten Diagramme gestaltet.

## **2.13 Statistik**

Alle angegebenen Werte bestehen aus Mittelwert und mittlerem Standardfehler (MW±SF). Zum statistischen Vergleich der Gruppen wurde eine Rangsummen-Varianzanalyse nach Kruskal und Wallis (1952) durchgeführt, wobei Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen mit dem Test nach Dunn berechnet wurden. Ergebnisse bei  $p < 0,05$  wurden als signifikant angenommen.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Vorversuche

##### 3.1.1 Dosisfindung des uveitogenen Melaninproteins

Die Spaltlampenuntersuchung zeigte bei zwei von fünf Tieren der mit 25 µg Melaninprotein immunisierten Gruppe ab dem 15. Tag eine vermehrte Dilatation und korkenzieherartige Schlängelung der Irisgefäße. Zwischen dem 17. und 18. Tag kamen vereinzelt Hornhautpräzipitate, Fibrinexsudate und hintere Synechien bis zur vollständigen Okklusion der Pupille hinzu.

Die höhere Antigendosis von 250 µg Melaninprotein hatte bereits zwischen dem 10. und 16. Tag bei 4 von 5 Tieren die obengenannten Symptome einer Uveitis zur Folge. Auffallend war, dass sich Hornhautpräzipitate [Abb. 5,7], Fibrinexsudate [Abb.6,7] und hintere Synechien bis zur vollständigen Pupillenokklusion [Abb. 6,9] innerhalb eines Tages außerordentlich schnell und teils auch ohne eine zuvor erkennbare Gefäßdilatation [Abb. 8] entwickelten.

##### 3.1.2 Induktion der EMIU ohne Adjuvantien

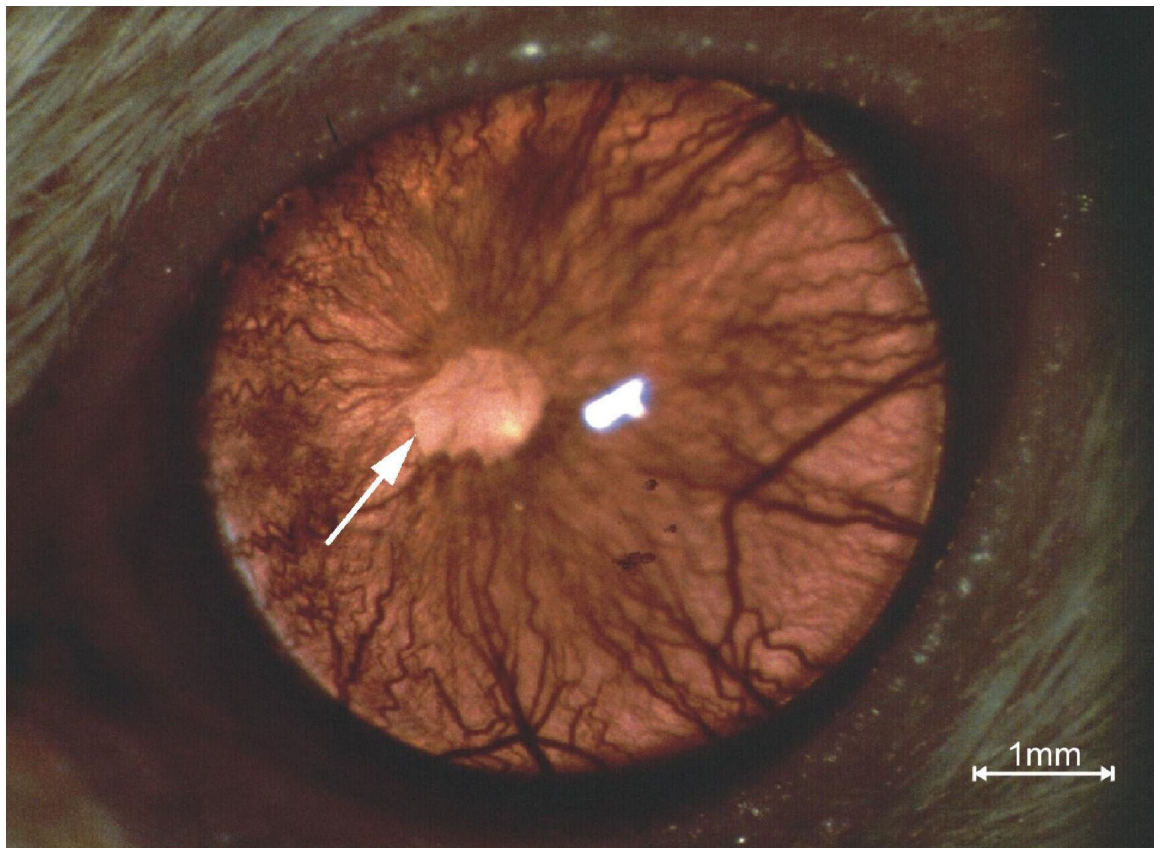
Bei den Tieren der Versuchsgruppe, die keine Adjuvantien erhalten hatte (n=6), wurden innerhalb von 21 Tagen keine Veränderungen des Augenvorderabschnittes beobachtet.

##### 3.1.3 Intravital-Fluoreszenz-Mikroskopie

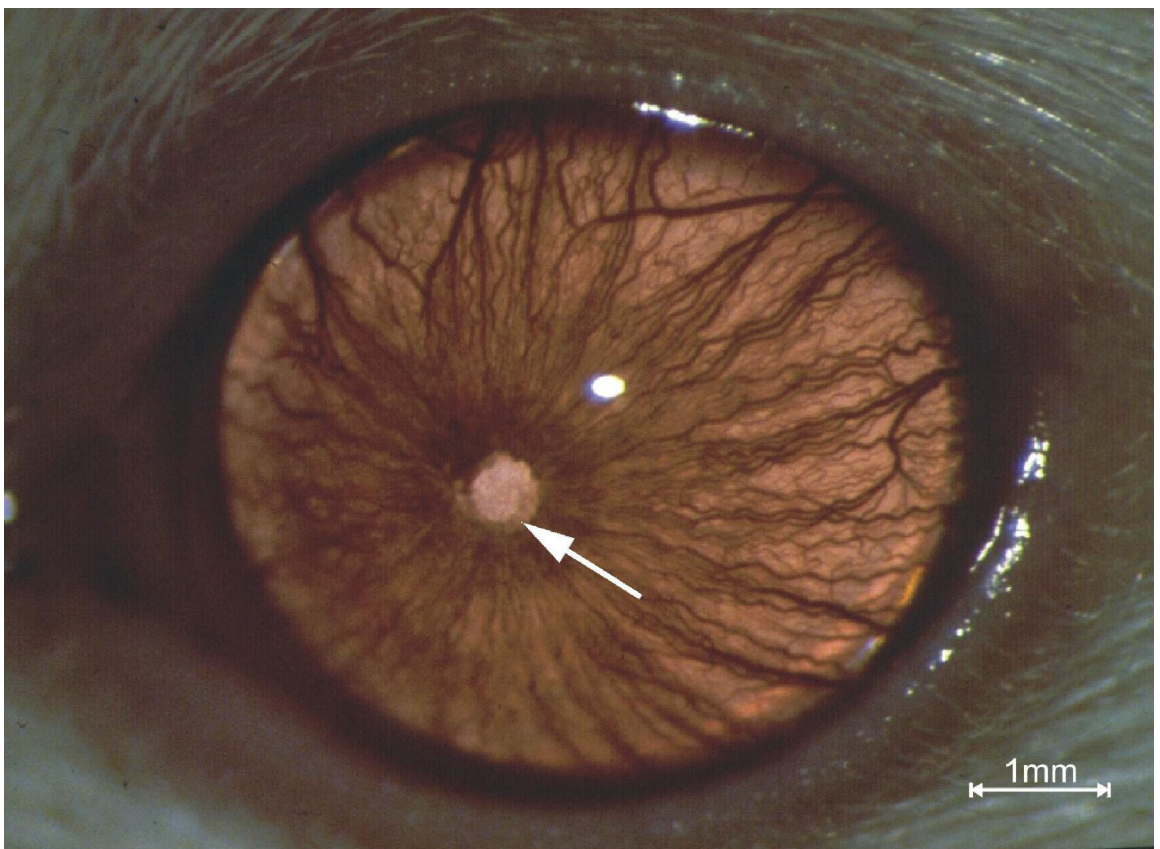
Die Methode der Intravitalmikroskopie war bei dem Modell der Experimentellen Melanin-induzierten Uveitis bis zum 10. Tag p.i. grundsätzlich anwendbar [Abb. 10]. Bei zwei der am 12. Tag untersuchten Tiere wurde die Qualität der Videobilder sehr stark durch Protein- und Zellexsudate beeinflusst, so dass nicht vertretbar hohe Fehlerquoten bei der Auswertung der Videosequenzen entstanden wären [Abb. 11]. Weiterhin konnte infolge der hohen Anzahl fluoreszierender Zellen nicht mehr genau zwischen intravasal und bereits interstitiell befindlichen Leukozyten unterschieden werden. Aus diesem Grund wurden am 12. Tag keine weiteren intravitalmikroskopischen Untersuchungen durchgeführt.



**Abbildung 5:** Hornhautpräzipitate einer Ratte mit EMIU (6 Tage p.i.).  
Fetter Pfeil – Iriskrause; dünner Pfeil – Präzipitate.

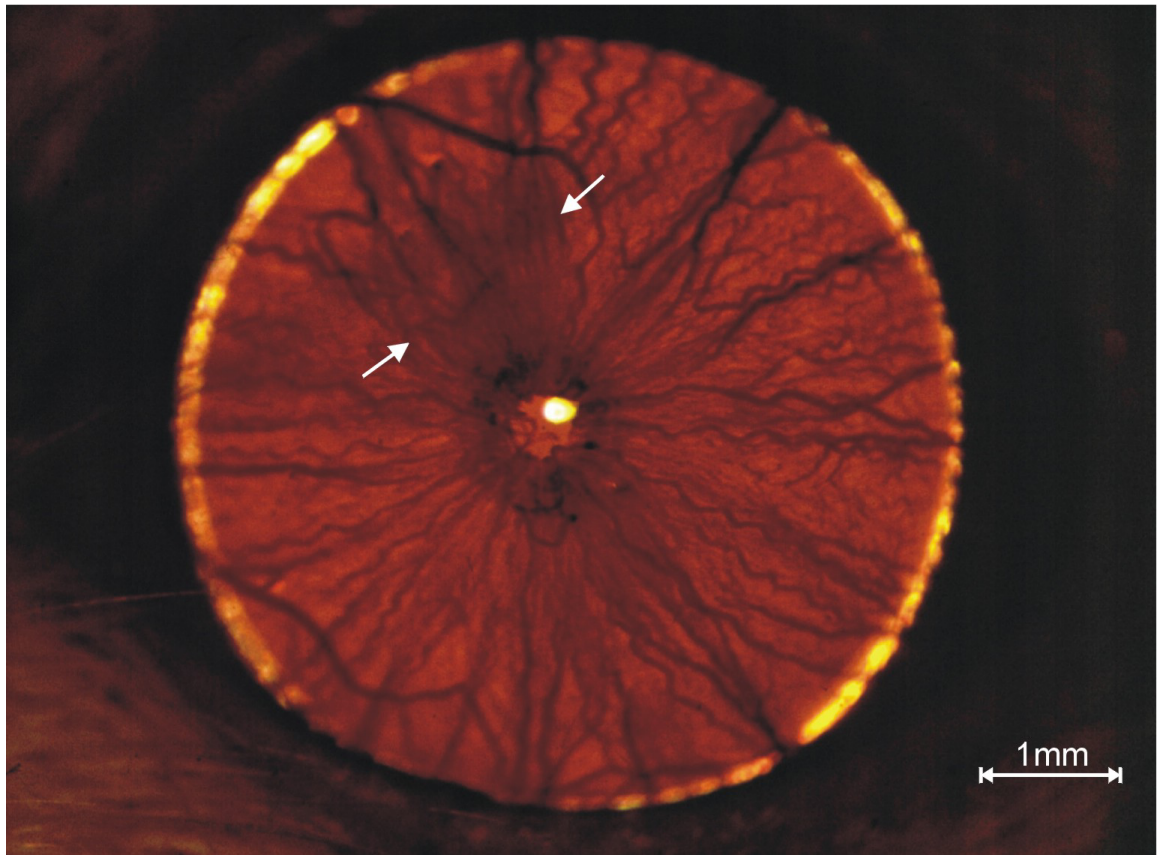


**Abbildung 6:** EMIU am 10. Tag: stärkere Dilatation und korkenzieherartige Schlängelung der Irisgefäße, durch Fibrin bedingte Unschärfe einzelner Irisbezirke, beginnende Ausbildung hinterer Synechien.



**Abbildung 7:** EMIU am 9. Tag: Irisgefäßdilatation, wenig Fibrin in der Vorderkammer und zusätzlich sichtbare Hornhautendothelbeschläge

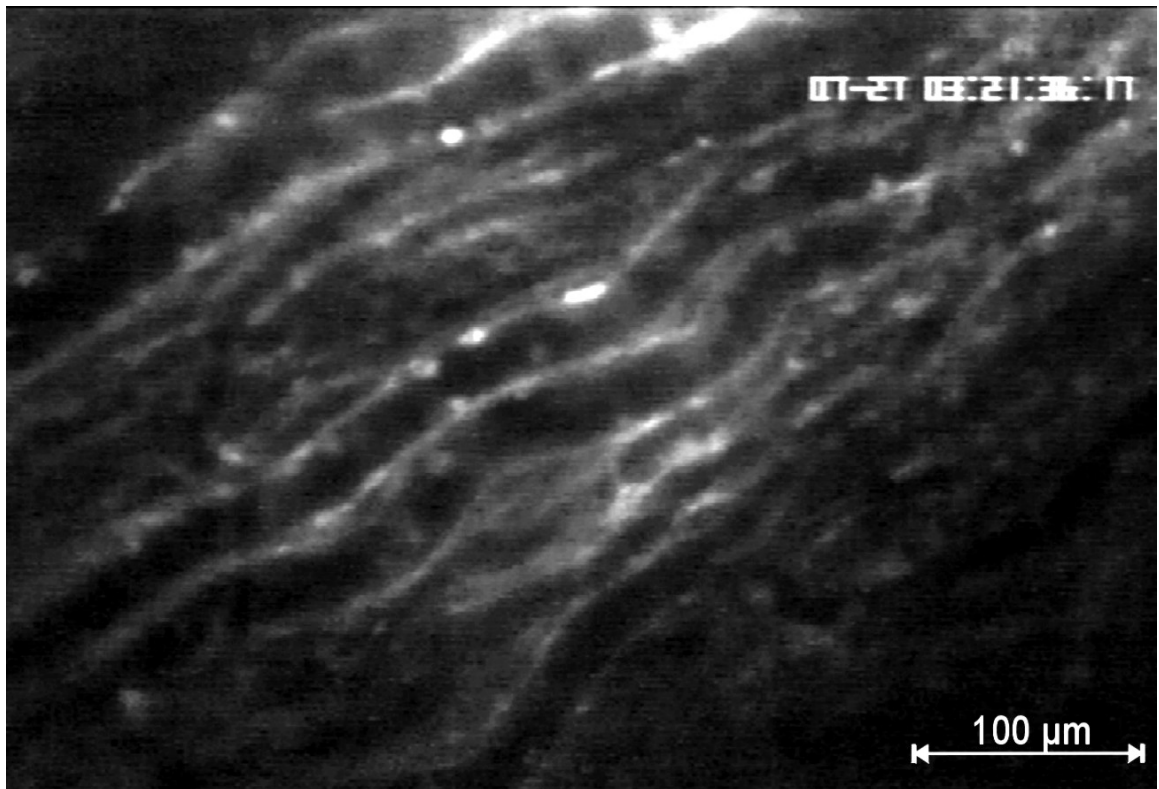




**Abbildung 8:** EMIU am 8. Tag p.i. - Irisgefäßdilatation bei einer Lewisratte, im regredienten Licht durch dunklere Schattierung andeutungsweise erkennbare Infiltration einzelner Irisbereiche (Pfeile).



**Abbildung 9:** EMIU am 14. Tag p.i. - Ausbildung einer Iris bombata mit Seclusio pupillae. Die Infiltration des zentralen Irisstromas ist deutlich durch dunklere Schattierung (Pfeile) und Strukturunschärfe zu erkennen.



**Abbildung 10:** Intravitalmikroskopisches Videostandbild von Irisvenolen einer Ratte mit EMIU (10. Tag). Helle Punkte entsprechen fest am Endothel haftenden Leukozyten, helle Streifen innerhalb des Gefäßlumens stellen im Fluss befindliche Leukozyten oder am Endothel entlang rollende Leukozyten dar.



**Abbildung 11:** Intravitalmikroskopisches Videostandbild von Irisvenolen einer Ratte mit EMIU (12. Tag). Auffallend ist eine durch Exsudate bedingte Bildunschärfe und die große Anzahl extravasal befindlicher sowie am Endothel haftender Leukozyten.

### **3.2 Experimentelle Melanin-induzierte Uveitis**

#### **3.2.1 Intravital-Fluoreszenz-Mikroskopie/ Videosequenzanalyse**

##### **3.2.1.1 Rollende Leukozyten bei unbehandelten Tieren (EMIU)**

Der Anteil der rollenden Leukozyten an der Gesamtzahl der einen definierten Gefäßabschnitt durchquerenden Leukozyten stieg erstmals am 6. Tag signifikant auf  $22,0 \pm 1,9$  gegenüber  $5,7 \pm 0,7$  Zellen/min bei nicht immunisierten Tieren (naiv) an, um am 8. Tag ein Maximum von  $40,8 \pm 4,2$  Zellen/min zu erreichen. Die vitalmikroskopischen Analysen der nur mit Adjuvantien behandelten Kontrollgruppe (Protokoll II) ergaben für rollende Leukozyten am 8. Tag keine signifikante Zunahme ( $10,3 \pm 1,2$  Zellen/min) [Abb. 12].

##### **3.2.1.2 Rollende Leukozyten (EMIU) nach Behandlung mit liposomalem Clodronat**

Die Behandlung von EMIU-Tieren mit liposomalem Clodronat (Protokoll III) bewirkte am 10. Tag einen Rückgang rollender Leukozyten ( $16,6 \pm 1,8$  vs.  $30,7 \pm 2,9$  Zellen/min) gegenüber unbehandelter EMIU, wogegen Leer-Liposomen die Zahl rollender Leukozyten bei EMIU (Protokoll IV, 10. Tag:  $34,8 \pm 4,2$  Zellen/min) nicht beeinflussten [Abb.12].

##### **3.2.1.3 Fest haftende Leukozyten bei unbehandelten Tieren (EMIU)**

Nicht immunisierte Tiere (naiv) zeigten  $59,67 \pm 7,09$  pro  $\text{mm}^2$  fest am Endothel haftende Leukozyten. Bei EMIU konnte eine Zunahme dieses Parameters auf  $175,42 \pm 18,24$  Zellen/ $\text{mm}^2$  am 8. Tag gemessen werden ( $p < 0,05$ ). Eine weitere Steigerung fand bis zum 10. Tag statt ( $371,71 \pm 30,67$  Zellen/ $\text{mm}^2$ ) ( $p < 0,05$ ). Die nur mit Adjuvantien behandelte Gruppe (Protokoll II) wies auch hier keine Veränderungen gegenüber nicht immunisierten Tieren auf (naiv) [Abb.12].

##### **3.2.1.4 Fest haftende Leukozyten (EMIU) nach Behandlung mit liposomalem Clodronat**

Die Zahl der über einen Beobachtungszeitraum von 20 Sekunden an der Gefäßwand haftenden Leukozyten war bei mit liposomalem Clodronat behandelten Tieren am 8. Tag um die Hälfte vermindert ( $88,29 \pm 12,97$  vs.  $175,42 \pm 18,24$  Zellen/ $\text{mm}^2$ ). Am 10. Tag lag dieser Wert mit  $128,51 \pm 12,91$  Zellen/ $\text{mm}^2$  etwas höher als jener am 8. Tag, zeigte aber eine Reduktion auf ein Drittel der Werte fest haftender Leukozyten bei EMIU-Tieren (Protokoll I) ( $p < 0,05$ ).

Die mit Leer-Liposomen behandelten EMIU-Gruppen (Protokoll IV) wiesen bei der Zahl fest haftender Leukozyten keinen signifikanten Unterschied zu EMIU-Gruppen am 8. Tag und 10. Tag auf [Abb.12].

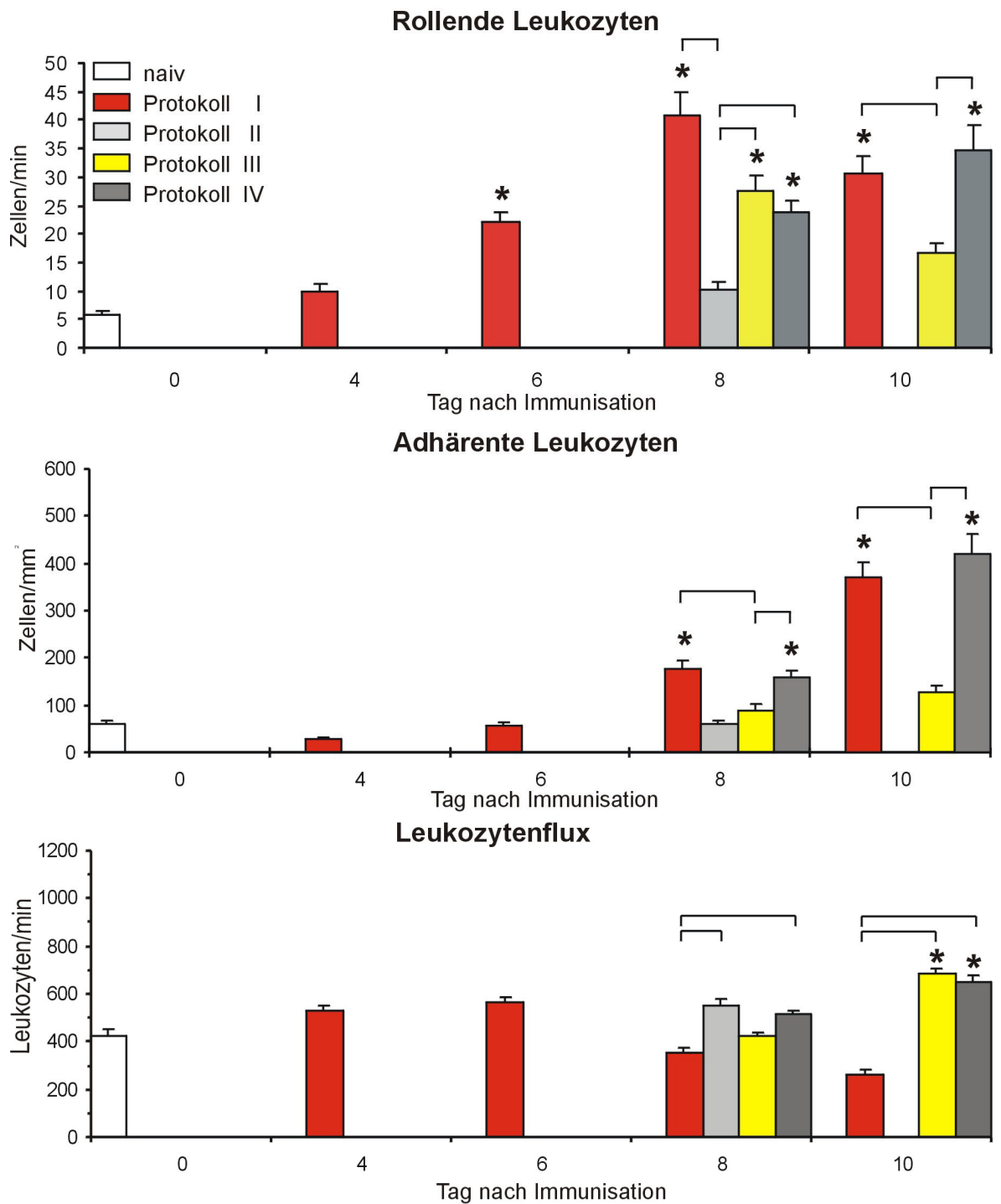
##### **3.2.1.5 Leukozytenflux bei unbehandelten Tieren (EMIU)**

Im Verlauf der okulären Entzündung (EMIU) nahm der Leukozytenflux in Irisvenolen bis zum 6. Tag zu ( $567 \pm 19$  /min). Danach fiel der Leukozytenflux bis zum 10. Tag auf  $260 \pm 19$  Zellen/min ab ( $p < 0,05$ ).

Ein signifikant höherer Leukozytenflux zeigte sich bei der nur mit Adjuvantien behandelten Gruppe (Protokoll II) am 8. Tag gegenüber EMIU-Tieren ( $553 \pm 25$  vs.  $350 \pm 26$  Zellen/min) ( $p < 0,05$ ) [Abb.12].

##### **3.2.1.6 Leukozytenflux (EMIU) nach Behandlung mit liposomalem Clodronat**

Die Zahl der einen definierten Gefäßabschnitt innerhalb einer Minute durchquerenden Leukozyten war bei mit liposomal verkapseltem Clodronat behandelten Tieren zum 8. Tag auf Werte von  $425 \pm 16$  /min und am 10. Tag bis auf  $685 \pm 24$  Zellen/min ( $p < 0,05$ ) gestiegen. Die mit Leer-Liposomen behandelte EMIU-Gruppe (Protokoll IV) zeigte am 8. Tag im Vergleich zur EMIU-Gruppe unter Clodronat-Behandlung keinen signifikanten Unterschied im Leukozytenflux. Am 10. Tag war der Flux von Leukozyten bei mit Clodronat-Liposomen ( $685 \pm 24$  /min) oder Leer-Liposomen ( $648 \pm 29$  Zellen/min) behandelten EMIU-Gruppen deutlich höher als bei nicht immunisierten Tieren (naiv:  $421 \pm 31$  Zellen/min) oder bei Tieren mit EMIU zum entsprechendem Zeitpunkt ( $p < 0,05$ ) [Abb.12].



**Abbildung 12:** Rollende und adhärente Leukozyten sowie Leukozytenflux in Irisvenolen bei EMIU. Als rollende Leukozyten wurden jene Zellen bezeichnet, die sich wesentlich langsamer als Zellen im Blutstrom direkt am Gefäßendothel entlang bewegen. Leukozyten, die sich während des Beobachtungszeitraumes von 20 Sekunden nicht fortbewegten, wurden als adhärente Zellen bezeichnet. Je Zeitpunkt und Gruppe wurden 6 Tiere untersucht.

Bei einer Tiergesamtzahl von n=60 wurden rollende, adhärente und frei fließende Leukozyten in 720 Gefäßsegmenten quantifiziert; *naiv*: nicht immunisierte, unbehandelte Tiere; *Protokoll I*: EMIU (mit bovinem Melaninprotein und Adjuvantien immunisierte Tiere); *Protokoll II*: mit Adjuvantien behandelte Tiere; *Protokoll III*: mit liposomalem Clodronat behandelte EMIU-Tiere; *Protokoll IV*: mit Leer-Liposomen behandelte EMIU-Tiere. Mittelwert±Standardfehler; p<0,05 im Vergleich einzelner Gruppen (Balken), im Vergleich zu naiv (Stern).

### 3.2.2 Kammerwasseranalyse

#### 3.2.2.1 Zellen bei unbehandelten Tieren (EMIU)

Am 8. Tag wurde erstmalig ein Anstieg der ins Kammerwasser emigrierten Zellen ( $24 \pm 4$  Zellen/ $\mu$ l) beobachtet. Die Zellzahl des Kammerwassers bei EMIU-Tieren stieg bis zum 10. Tag auf  $82 \pm 17$  Zellen/ $\mu$ l gegenüber  $7 \pm 1$  Zellen/ $\mu$ l bei nicht immunisierten Tieren an (naiv) ( $p < 0,05$ ). Die Tiere, denen nur Adjuvantien verabreicht wurden (Protokoll II), wiesen eine mit nicht immunisierten Tieren vergleichbare Zellzahl des Kammerwassers auf [Abb.13].

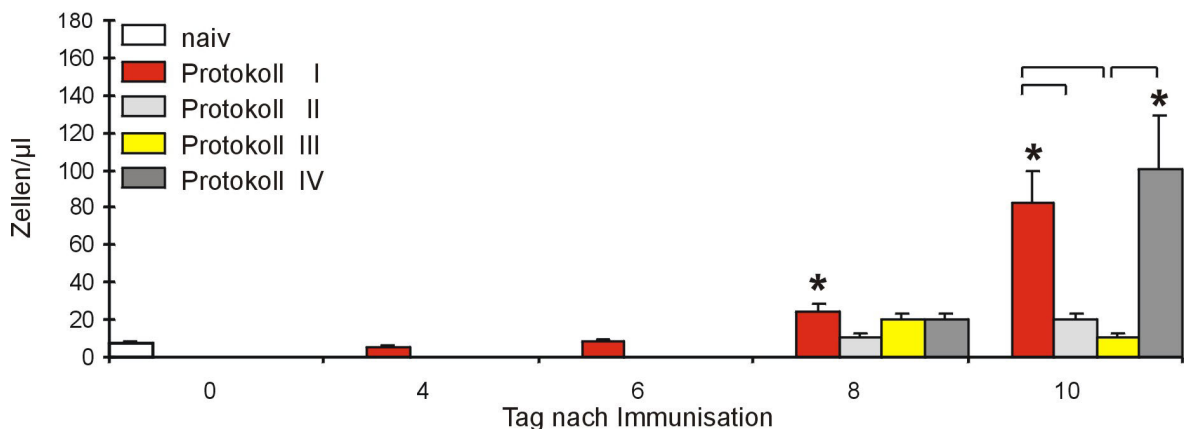
#### 3.2.2.2 Zellen (EMIU) nach Behandlung mit liposomalem Clodronat

Am 8. Tag konnten keine signifikanten Unterschiede der Zellzahl im Kammerwasser zwischen der EMIU-Gruppe und denen mit liposomalem Clodronat bzw. mit Leer-Liposomen (Protokoll IV) behandelten EMIU-Gruppen festgestellt werden.

Unter Behandlung mit liposomalem Clodronat emigrierten bei EMIU-Tieren am 10. Tag mit  $11 \pm 2$  Zellen/ $\mu$ l deutlich weniger Zellen in das Kammerwasser als bei EMIU-Tieren ( $82 \pm 17$  Zellen/ $\mu$ l) oder mit Leer-Liposomen behandelten EMIU-Tieren (Protokoll IV:  $100 \pm 29$  Zellen/ $\mu$ l).

Keine signifikanten Unterschiede der Zellzahl im Kammerwasser war zwischen nur mit Adjuvantien behandelten Tieren und mit Clodronat behandelten EMIU-Tieren feststellbar (Protokoll II vs. Protokoll III) [Abb.13].

#### Zellen im Kammerwasser



**Abbildung 13:** Zellen im Kammerwasser bei EMIU. Bei allen Tieren ( $n=66$ ) wurde Kammerwasser aus beiden Augen entnommen. Bei jedem Auge wurde zweimal  $1\mu$ l Kammerwasser analysiert und aus beiden Zählungen/Messungen der Mittelwert gebildet; *naiv*: nicht immunisierte, unbehandelte Tiere; *Protokoll I*: EMIU (mit bovinem Melaninprotein und Adjuvantien immunisierte Tiere); *Protokoll II*: nur mit Adjuvantien behandelte Tiere; *Protokoll III*: mit liposomalem Clodronat behandelte EMIU-Tiere; *Protokoll IV*: mit Leer-Liposomen behandelte EMIU-Tiere. Mittelwert $\pm$ Standardfehler;  $p < 0,05$  im Vergleich einzelner Gruppen (Balken); im Vergleich zu naiv (Stern).



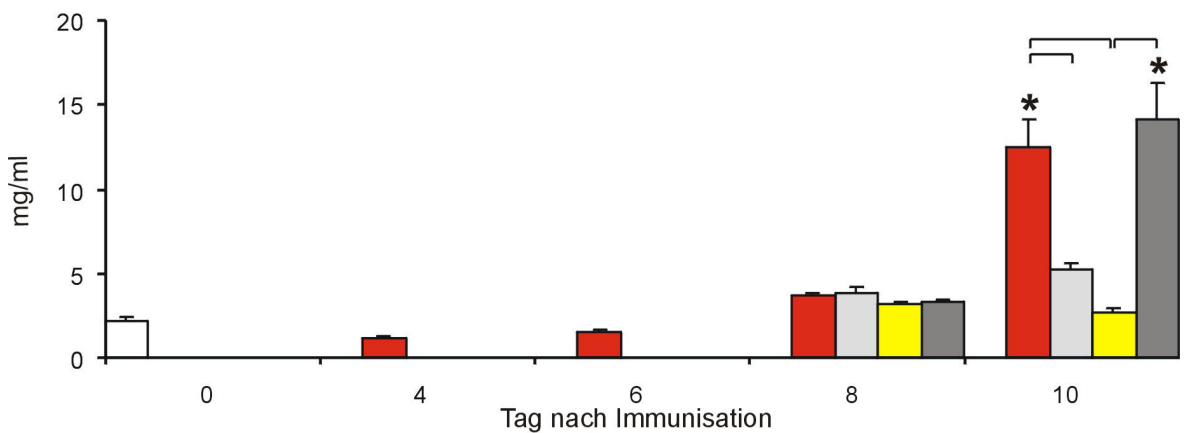
### 3.2.2.3 Protein bei unbehandelten Tieren (EMIU)

Die Erhöhung der Proteinkonzentration bei EMIU auf  $12,52 \pm 1,66$  mg/ml am 10. Tag gegenüber Werten von  $2,15 \pm 0,31$  mg/ml nicht immunisierter Tiere (naiv) war signifikant [Abb.14].

### 3.2.2.4 Protein (EMIU) nach Behandlung mit liposomalem Clodronat

Bei der mit liposomalem Clodronat behandelten EMIU-Gruppe war die Proteinexsudation in das Kammerwasser mit  $2,7 \pm 0,25$  mg/ml um ein Vielfaches geringer ausgeprägt als bei der mit Leer-Liposomen behandelten EMIU-Gruppe (Protokoll IV:  $14,17 \pm 2,08$  mg/ml) und der EMIU-Gruppe ( $p < 0,05$ ). Es handelt sich dabei um eine mit nicht immunisierten Tieren vergleichbare Proteinkonzentration (naiv) [Abb.14].

#### Protein im Kammerwasser



**Abbildung 14:** Protein im Kammerwasser bei EMIU. Bei allen Tieren (n=66) wurde Kammerwasser aus beiden Augen entnommen. Bei jedem Auge wurde zweimal 1µl Kammerwasser analysiert und aus beiden Zählungen/Messungen der Mittelwert gebildet; *naiv*: nicht immunisierte, unbehandelte Tiere; *Protokoll I*: EMIU (mit bovinem Melaninprotein und Adjuvantien immunisierte Tiere); *Protokoll II*: mit Adjuvantien behandelte Tiere; *Protokoll III*: mit liposomalem Clodronat behandelte EMIU-Tiere; *Protokoll IV*: mit Leer-Liposomen behandelte EMIU-Tiere. Mittelwert±Standardfehler;  $p < 0,05$  im Vergleich einzelner Gruppen (Balken); im Vergleich zu naiv (Stern).



### 3.2.3 Blutbild

#### 3.2.3.1 Gesamtleukozytenzahl bei unbehandelten Tieren (EMIU)

Als Zeichen einer frühen Entzündungsreaktion stieg die absolute Leukozytenzahl im peripheren Blut bis zum 6. Tag stetig an ( $8,9 \pm 1,9 \times 10^9/l$ ) und fiel bis zum 10. Tag auf  $1,22 \pm 0,12 \times 10^9/l$  ab ( $p < 0,05$ ) [Abb.15].

#### 3.2.3.2 Gesamtleukozytenzahl (EMIU) nach Behandlung mit liposomalem Clodronat

Am 10. Tag wies die Leukozytenzahl im peripheren Blut von EMIU-Tieren ( $1,22 \pm 0,12 \times 10^9/l$ ) und mit liposomalem Clodronat behandelten EMIU-Tieren ( $7,90 \pm 1,37 \times 10^9/l$ ) einen signifikanten Unterschied auf ( $p < 0,05$ ) [Abb.15].

#### 3.2.3.3 Lymphozyten bei unbehandelten Tieren (EMIU)

Das periphere Blutbild nicht immunisierter Tieren (naiv) hatte einen Lymphozytenanteil von  $72,62 \pm 2,89$  %. Bei EMIU-Tieren nahm der Lymphozytenanteil im Entzündungsverlauf ständig ab. Am 8. Tag wurden die niedrigsten Werte gemessen ( $25,55 \pm 10,12$  % Lymphozyten). Auffällig war am 8. Tag der noch niedrigere Lymphozytenanteil von  $14,07 \pm 1,43$  % bei nur mit Adjuvantien behandelten Tieren im Vergleich zu nicht immunisierten Tieren (Protokoll II vs. naiv) ( $p < 0,05$ ) [Abb.15].

#### 3.2.3.4 Lymphozyten (EMIU) nach Behandlung mit liposomalem Clodronat

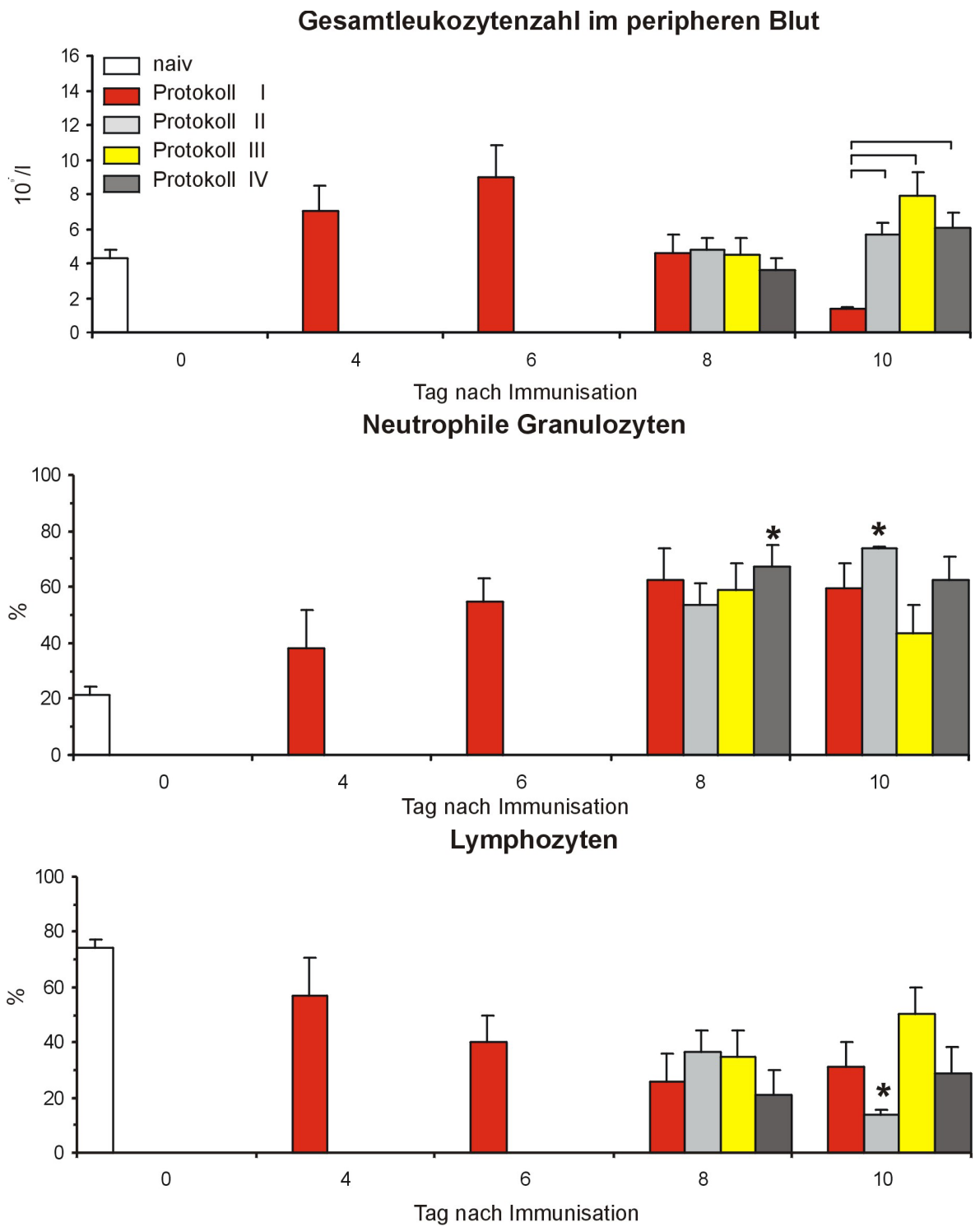
Der Anteil der Lymphozyten im Differentialblutbild bei mit liposomalem Clodronat behandelten Tieren stieg tendenziell bis zum 10. Tag auf  $49,20 \pm 11,51$  % gegenüber  $28,47 \pm 9,65$  % bei mit Leer-Liposomen behandelten EMIU-Tieren an (Protokoll IV). Es zeigte sich allerdings keine Signifikanz [Abb.15].

#### 3.2.3.5 Neutrophile bei unbehandelten Tieren (EMIU)

Keinen signifikanten Unterschied zeigten die prozentualen Anteile Neutrophiler im peripheren Blut von EMIU-Tieren und nur mit Adjuvantien behandelten Tieren (Protokoll II). Der Neutrophilenwert dieser Tiere war allerdings am 10. Tag mit  $73,98 \pm 0,60$  % deutlich höher ausgeprägt als der Wert von  $18,15 \pm 1,52$  % bei nicht immunisierten Tieren (naiv) ( $p < 0,05$ ) [Abb.15].

#### 3.2.3.6 Neutrophile (EMIU) nach Behandlung mit liposomalem Clodronat

Am 8. und 10. Tag war im prozentualen Anteil Neutrophiler im peripheren Blut keine signifikante Differenz zwischen EMIU-Tieren und mit liposomalem Clodronat oder mit Leerliposomen behandelten EMIU-Tieren (Protokoll IV) feststellbar. Jedoch war der Anteil Neutrophiler bei der mit Leer-Liposomen behandelten EMIU-Gruppe am 8. Tag deutlich höher als bei nicht immunisierten Tieren ( $67,00 \pm 9,10$  % vs.  $18,15 \pm 1,52$  %; Protokoll IV vs. naiv) ( $p < 0,05$ ) [Abb.15].



**Abbildung 15:** Gesamtleukozytenzahl, Neutrophile und Lymphozyten bei EMIU. Allen Tieren (n=66) wurde eine Blutprobe entnommen; *naiv*: nicht immunisierte, unbehandelte Tiere; *Protokoll I*: EMIU (mit bovinem Melaninprotein und Adjuvantien immunisierte Tiere); *Protokoll II*: mit Adjuvantien behandelte Tiere; *Protokoll III*: mit liposomalem Clodronat behandelte EMIU-Tiere; *Protokoll IV*: mit Leer-Liposomen behandelte EMIU-Tiere. Mittelwert±Standardfehler; p<0,05 im Vergleich einzelner Gruppen (Balken), im Vergleich zu naiv (Stern).

### 3.2.4 Blutplasmaanalyse

#### 3.2.4.1 $TNF-\alpha$ bei unbehandelten Tieren (EMIU)

Das Serum  $TNF-\alpha$  zeigte einen biphasischen Verlauf mit einem ersten Anstieg am Tag 4 ( $191,7 \pm 68,3$  vs.  $51,7 \pm 16,1$  pg/ml; Protokoll I vs. naiv). Zum 10. Tag stieg das  $TNF-\alpha$  im Serum auf extrem hohe Werte von  $954,9 \pm 216,3$  pg/ml ( $p < 0,05$ ) [Abb.16].

#### 3.2.4.2 $TNF-\alpha$ (EMIU) nach Behandlung mit liposomalem Clodronat

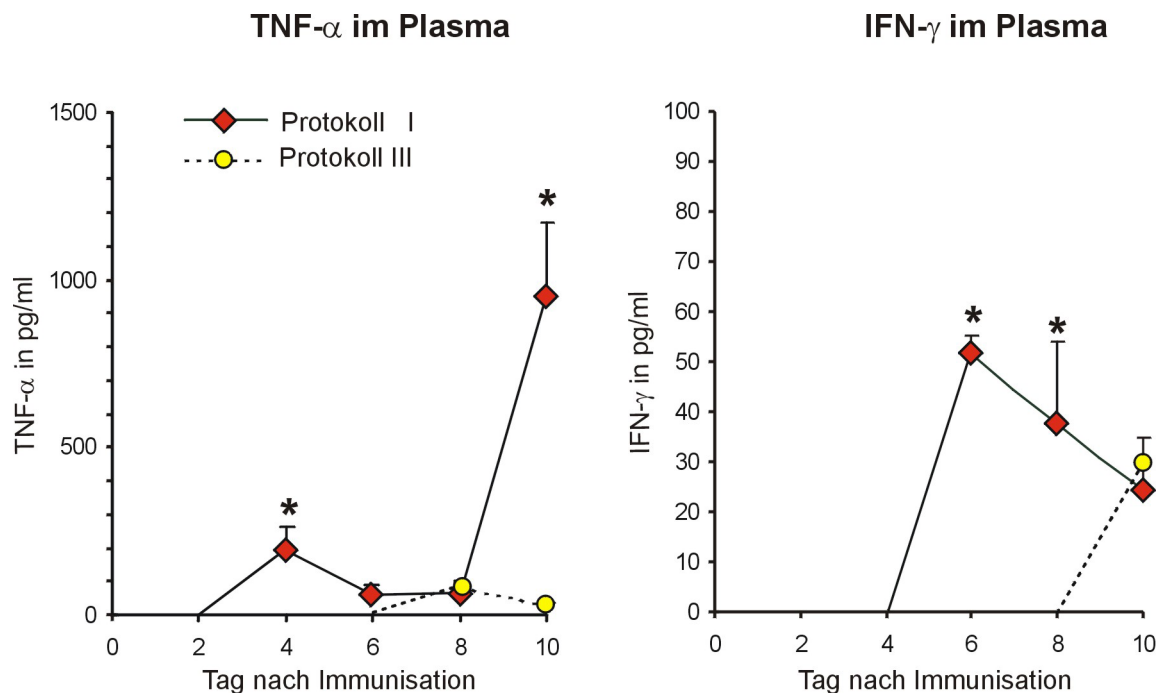
Am 8. Tag waren bei mit Clodronat-Liposomen behandelten Tieren nur sehr geringe Konzentrationen an Tumornekrosefaktor- $\alpha$  nachweisbar. Sie zeigten keinen signifikanten Unterschied zu nicht immunisierten Tieren (Protokoll III vs. naiv). Verglichen mit dem Entzündungsmodell EMIU bewirkte die Behandlung mit Clodronat am 10. Tag eine signifikante Reduktion von  $TNF-\alpha$  im Plasma:  $32,5 \pm 2,7$  vs.  $954,9 \pm 216,3$  pg/ml (Protokoll III vs. Protokoll I) ( $p < 0,05$ ) [Abb.16].

#### 3.2.4.3 $IFN-\gamma$ bei unbehandelten Tieren (EMIU)

Am 6. Tag war bei Tieren mit EMIU die höchste  $IFN-\gamma$ -Konzentration von  $51,5 \pm 3,8$  pg/ml nachweisbar. Im weiteren Verlauf fielen die  $IFN-\gamma$ -Konzentrationen bis zum 8. Tag ( $37,7 \pm 16,2$  pg/ml; Protokoll I) und zum 10. Tag ab ( $24,4 \pm 5,1$  pg/ml) [Abb.16].

#### 3.2.4.4 $IFN-\gamma$ (EMIU) nach Behandlung mit liposomalem Clodronat

Ein Nachweis von  $IFN-\gamma$  mit einer Konzentration von  $28,4 \pm 6,3$  pg/ml im Plasma gelang bei der mit Clodronat-Liposomen behandelten EMIU-Gruppe am 10. Tag. Ansonsten lagen die Werte für  $IFN-\gamma$  unter der Nachweisgrenze des ELISA-Kits von 13 pg/ml ( $p < 0,05$ ) [Abb.16].

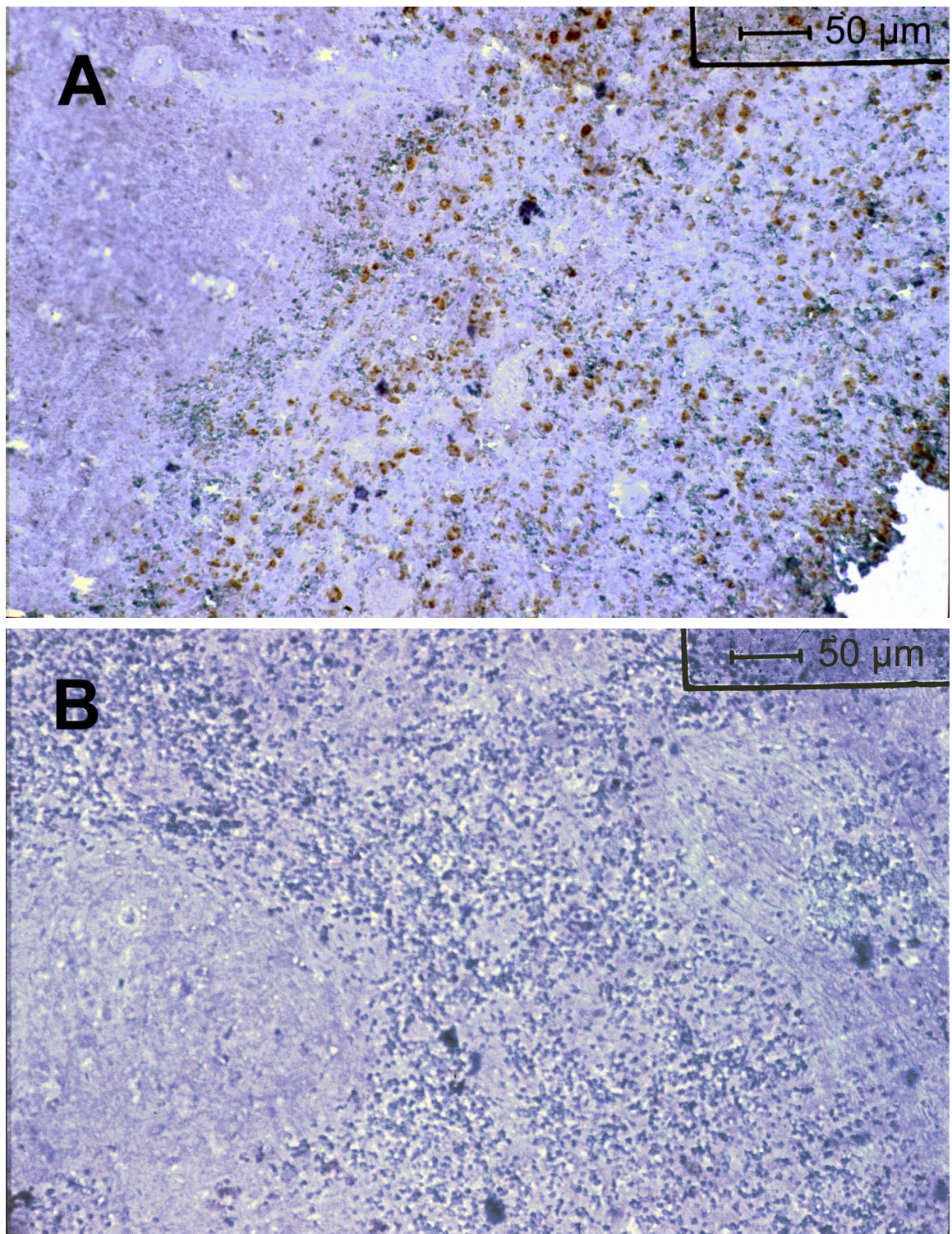


**Abbildung 16:**  $TNF-\alpha$  und  $IFN-\gamma$  im Plasma bei EMIU. Protokoll I: EMIU (mit Melaninprotein und Adjuvantien immunisierte Tiere); Protokoll III: mit liposomalem Clodronat behandelte EMIU-Tiere. Nachweisgrenze des  $TNF-\alpha$ / $IFN-\gamma$ -ELISA-Kits: 20 pg/ml bzw. 13 pg/ml. Mittelwert  $\pm$  Standardfehler;  $p < 0,05$  im Vergleich zu naiv (Stern).



### 3.2.5 Immunohistologie der Milz

Zur Verifizierung der Makrophagendepletion entsprechender Versuchstiere wurden immunhistochemische Untersuchungen der Milz durchgeführt. Es zeigte sich, dass immunisierte oder zusätzlich mit Leerliposomen behandelte Tiere reichlich ED1+-Zellen in der Marginalzone der Milz aufwiesen [Abb. 17]. Im Milzgewebe der mit liposomalem Clodronat behandelten EMIU-Tiere waren diese Zellen nicht nachzuweisen [Abb. 17].



**Abbildung 17:** Immunhistochemie der Milz. Zur Verifizierung der Clodronat-Liposomen-Behandlung wurden immunhistochemische Untersuchungen an Milzgewebe durchgeführt. Das zur Markierung ED1+-Makrophagen verwendete Chromogen zeigte sich durch Braunfärbung **[A]**. Nach anhaltender Clodronat-Liposomen-Behandlung lassen sich keine Makrophagen darstellen **[B]**.

## 4 Diskussion

Die Experimentelle Melaninprotein-induzierte Uveitis der Ratte ist ein Modell für die akute nicht-infektiöse intraokulare Entzündung mit autoimmuner Pathogenese. Die Symptomatik ist der bei M. Behçet, M. Bechterew oder dem Vogt-Koyanagi-Harada-Syndrom auftretenden anterioren Uveitis ähnlich.

In dieser Studie wurden Ratten zur Induktion der EMIU mit 250 µg BMA immunisiert. Das Immunogen wurde in Kombination mit komplettem Freund-Adjuvans (CFA) und Pertussistoxin (PTX) injiziert, da die Immunisation unter Verzicht auf die genannten Immunstimulantien keine Symptome einer Uveitis hervorrief. Möglicherweise hatte die aus boviner Choroidea aufgereinigte Substanz eine zu geringe Antigenkonzentration, so dass erst eine entsprechend höhere Dosis ausreichend uveitogen gewirkt hätte. Andererseits müsste die verwendete Menge im Vergleich zur Literatur ausreichend hoch gewesen sein (Bora 1997).

Bei der Manifestation der EMIU können hauptsächlich CD4+-T-Lymphozyten, Neutrophile Granulozyten und Monozyten im vorderen Segment des Auges nachgewiesen werden (Kim 1995). Rekrutierte ED1+-Monozyten haben dabei in Iris und Ziliarkörper einen vielfach höheren Anteil als gewebeständige ED2+-Monozyten (Histiozyten) (Kim 1995, McMenamin 1997a). Auch die Zahl dendritischer Zellen nimmt bis auf das Dreifache der normalen Zelldichte zu (Kim 1995, McMenamin 1997a). Neben der stark ansteigenden Zahl dendritischer Zellen und monozytärer Zellen wandelt sich auch deren Morphologie von einem dendriformen bzw. pleomorphem Charakter zu einer regelmäßigen Zellform. McMenamin und Butler deuten die ersichtlichen Veränderungen der Zellmorphologie sowohl als Zeichen der verstärkten Aktivierung und erhöhten Mobilität als auch für gesteigerte phagozytotische Aktivität (Butler und McMenamin 1996, McMenamin 1997a).

Makrophagen sind neben ihrer Fähigkeit zur Phagozytose und ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen in die Regulation und die Effektorphase immunologischer Vorgänge involviert (Unanue 1984, Unanue und Allen 1987). Zur Untersuchung funktioneller Aspekte kann in vivo die selektive Depletion von Makrophagen durch liposomal verkapseltes Clodronat angewandt werden (van Rooijen 1992). Clodronat-Liposomen werden von Makrophagen in Milz, Leber, Lunge und Lymphknoten (Deleamarre 1990, van Rooijen 1989a) sowie durch Blutmonozyten phagozytiert (Thepen 1990, van Rooijen 1990). Nach Internalisation der Liposomen wird Clodronat aus Phagolysosomen freigesetzt und löst den apoptotischen Zelltod aus. Verschiedene Hypothesen für zugrunde liegenden Mechanismen werden diskutiert: Es besteht die Möglichkeit, dass Clodronat mit Eisenionen Chelatkomplexe bildet und auf Grund dessen die intrazellulären Eisenspeicher erschöpft (Mönkkönen und Heath 1993, van Rooijen 1993). Clodronat könnte auch direkt auf den intrazellulären ATP-Metabolismus Einfluß haben (Pelorgeas 1992, Rogers 1992, van Rooijen 1993). Des weiteren gehört Clodronat zur Gruppe der Biphosphonate, die für ihre starke Affinität zu Kalzium-Ionen bekannt sind. Sonstige Biphosphonate und andere Substanzen mit starker Kalziumaffinität haben eine geringere makrophagentoxische Wirkung als Clodronat. Saito und Fidler stellten eine für Makrophagen toxische Wirkung chlorierter Substanzen fest (Fidler 1977, Saito und Yamaguchi 1985). Deswegen ist die Toxizität von Clodronat möglicherweise in der Kombination von hoher Kalziumaffinität der Biphosphonate und der strukturellen Chlorid-Gruppen begründet (van Rooijen 1989a, van Rooijen und Poppema 1992). Andere phagozytotisch wirkende Zellen, wie z.B. Neutrophile Granulozyten und Endothelzellen, oder nicht-phagozytierende Zellen, wie z.B. T- und B-Lymphozyten, bleiben durch Clodronat allerdings unbeeinflusst (Claassen 1990, Qian 1994, Schmidt-Weber 1996). Freies Clodronat durchdringt nur in extrem hohen Konzentrationen Zellmembranen. Darüber hinaus weist Clodronat im Blut und in anderen Körperflüssigkeiten eine extrem kurze Halbwertszeit von einigen Minuten auf (Fleisch 1988).

Die selektive Makrophageneliminierung wirkte sich stark supprimierend auf die Entzündungsreaktion bei einer Reihe autoimmunologischer Tiermodelle aus, so z.B. bei der Experimentellen Allergischen Enzephalomyelitis (EAE) (Huitinga 1995), bei der Experimentellen Autoimmunen Neuritis (EAN) (Jung 1993), bei der Experimentellen Arthritis (van Lent 1994) und bei der Experimentellen Pigmentepithelmembran-Protein induzierten Uveitis (EAPU) (Broekhuysse 1997).

Morphologische Studien bei EMIU (McMenamin 1997b) lassen vermuten, dass Makrophagen gleichfalls in Prozesse eingebunden sind, die die EMIU generieren und medieren.

Ziel der Clodronatgabe war es, über den gesamten Untersuchungszeitraum eine anhaltende Makrophagendepletion zu erreichen. Deshalb wurde den Tieren bereits 2 Tage vor der Immunisation Clodronat-Liposomen intraperitoneal appliziert. Die Behandlung wurde am 1. Tag nach Immunisation fortgesetzt, um einer durch komplettes Freund-Adjuvans hervorgerufenen vorzeitigen Repopulation von Peritoneal- und Omentalmakrophagen vorzubeugen (Biewenga 1995). Makrophagen stellen etwa 70–90% der Peritonealzellen des menschlichen und tierischen Organismus (Bos 1988, Plasman und Vray 1993) und sind nicht vollständig durch liposomales Clodronat zu



eliminieren (Soesatyo 1991). Zudem setzt die Repopulation von Peritonealmakrophagen bereits nach 3–4 Tagen ein (Soesatyo 1991). Daher erfolgten weitere intraperitoneale Clodronat-Injektionen im Abstand von maximal 3 Tagen. Eine Ursache für diese relativ frühzeitige Repopulation können Makrophagen des Omentum majus sein (Shimotsuma 1991, Wijffels 1992). Für die Repopulation kommen gleichermaßen migrierende monozytäre Vorläuferzellen des Knochenmarks in Frage, da die intravenöse Applikation von liposomalem Clodronat zwar Blutmonozyten, aber nicht deren Vorläufer im Knochenmark eliminiert (Huitinga 1992). Neben der Peritonealhöhle und dem Omentum majus werden durch intraperitoneale Clodronat-Injektionen auch Makrophagen in Milz, Leber und thymikolymphatische Makrophagen eliminiert (van Rooijen 1989b, van Rooijen 1990). Daher vermuten van Rooijen et al. einen Übertritt von Liposomen in die Blutbahn über das Omentum und über drainierende Lymphgefäße.

Im Beobachtungszeitraum der vorliegenden Studie lag die Manifestationsrate einer Uveitis anterior bei annähernd 80 %. Iridozyklitische Veränderungen des Augenvorderabschnittes wie Irishyperämie, Vaskulitis und Fibrin in der Vorderkammer waren bei spaltlampenmikroskopischen Untersuchungen zwischen dem 8. und 10. Tag erkennbar. Bei fortgeschrittenem Verlauf kamen speckige Hornhautpräzipitate, Blutungen in die Vorderkammer, hintere Synechien bis zur totalen Okklusion mit Ausbildung einer Iris bombata hinzu. Entsprechende Beobachtungen wurden auch durch Chan und Broekhuysen beschrieben (Broekhuysen 1991, Chan 1994).

Im klinischen Alltag ist der Nachweis von Zellen im Kammerwasser für eine Uveitis anterior pathognomonisch. Die Analyse der Zellzahl und Proteinkonzentration im Kammerwasser zeigte bei immunisierten Ratten unter Behandlung mit Clodronat keinen Unterschied zu nicht immunisierten Tieren bzw. eine signifikante Reduktion im Vergleich zu EMIU-Tieren. In spaltlampenmikroskopischen Untersuchungen waren ebenfalls keine der bei EMIU zu beobachtenden Symptome feststellbar. Die Behandlung immunisierter Tiere mit Leer-Liposomen hatte demgegenüber keine suppressierende Auswirkung auf den Entzündungsverlauf.

Schon 1998 hatte Broekhuysen am Modell der EMIU Makrophagendepletionsstudien durchgeführt (Broekhuysen 1997). Die Behandlung mit liposomalem Clodronat setzte relativ spät vor dem zu erwartenden Entzündungsbeginn und während der sich manifestierenden Entzündung ein. Die durch Broekhuysen vorgenommene Makrophageneliminierung bewirkte keine Veränderung des Entzündungsverlaufes bei EMIU. Broekhuysen nimmt daher an, dass Makrophagen als Effektorzellen für die EMIU unbedeutend sind. Statt dessen zieht er zytotoxische T-Lymphozyten als Effektorzellen bei EMIU in Betracht (Broekhuysen 1997). Chan und McMenamin beschreiben das Vorherrschen von T-Lymphozyten über Makrophagen während des gesamten EMIU-Verlaufs (Chan 1994, McMenamin 1997b). Diese Erkenntnisse und die in der vorliegenden EMIU-Studie durch frühe Clodronat-Gabe bewirkte Suppression der Entzündung weisen auf die Entzündung generierende und medierende Funktionen von Makrophagen bei der EMIU hin. Das könnte eine weitere Erklärung sein, warum eine Makrophagendepletion zu späteren Zeitpunkten keinen anti-inflammatorischen Effekt zeigt (Broekhuysen 1997). Es ist bekannt, dass Makrophagen als antigenpräsentierende Zellen eine zentrale Rolle in der zellvermittelten Immunität einnehmen, indem sie Antigenpeptide durch Expression von MHC-II-Molekülen gegenüber T-Helferzellen (CD4+-T-Lymphozyten) präsentieren. Neben Makrophagen stimulieren daraufhin aktivierte CD4+-T-Lymphozyten durch Zell-Zell-Interaktionen und durch sezernierte Zytokine entsprechende Effektorzellen, die für entzündliche Veränderungen an Zielstrukturen verantwortlich sind (D'Ambrosio 1999).

Die Emigration von Leukozyten in entzündetes Gewebe wird durch Adhäsionsmoleküle vermittelt, die auf der Oberfläche von Leukozyten und vaskulären Endothelzellen exprimiert werden. Diese Moleküle ermöglichen die kontrollierte Rekrutierung spezifischer Entzündungszellen aus der Blutzirkulation in das Zielgewebe.

Der Extravasation von Leukozyten gehen mehrere Stadien der Interaktion zwischen vaskulärem Endothel und Leukozyten voran. Zunächst besteht eine sehr geringe Affinität zwischen den Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten und denen auf Endothelzellen (Selectine). Als Folge rollen Leukozyten an der inneren Gefäßwand entlang. Bei weiterer Aktivierung kommt es zu einer starken Haftung von Leukozyten am Gefäßendothel. Sie ist durch hochaffine Interaktion zwischen Integrinen und Adhäsionsmolekülen der Ig-Superfamilie bedingt (Carlos und Harlan 1994). Durch Anwendung der Intravitalmikroskopie können diese Phänomene am Auge in vivo beobachtet und quantifiziert werden, ohne dass Einflüsse durch invasive Präparationen zu erwarten sind (Batz 1995).

In der vorliegenden Studie konnten erstmalig Zell-Zell-Interaktionen in Irisvenolen bei der EMIU beobachtet werden. Zur Analyse der frühen Entzündungsreaktion wurde die Methode der Intravitalmikroskopie gewählt und Untersuchungen bis zum 10. Tag nach Immunisation (p.i.) vorgenommen.

Des weiteren zeigten die Vorversuche, dass die Videobildqualität während der inflammatorischen Spätphase, das heißt bei Auftreten spaltlampenmikroskopischer Symptome, stark durch in das Kammerwasser exsudiertes Protein beeinträchtigt wird. In diesen Fällen wären keine verlässlichen Analysen der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion unter Anwendung der Intravitalmikroskopie möglich gewesen. Kim und Chan berichten von einer zunehmenden Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (CD54) und LFA-1 (CD11a/CD18) 5 bis 7 Tage nach der Immunisation mit Melanin-assoziiertem Protein (Chan 1994, Kim 1994). Tatsächlich wurde das durch Selectine hervorgerufene Rollen von Leukozyten das erste Mal verstärkt am 6. Tag p.i. beobachtet. Hingegen nahm die durch Integrine vermittelte feste Haftung von Leukozyten am Endothel erstmals am 8. Tag zu und steigerte sich weiterhin bis zum 10. Tag. Bisher fehlten direkte quantitative Analysen der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion während früher Entzündungsstadien bei der EMIU.

Wie anfänglich beschrieben, konnte die intraokulare Entzündungssymptomatik bei EMIU durch Makrophageneliminierung supprimiert werden. Übereinstimmend zeigen die intravitalmikroskopischen Daten der vorliegenden Studie, dass die für eine Entzündung charakteristischen Adhäsionsphänomene von Leukozyten am vaskulären Endothel durch Makrophagendepletion deutlich unterdrückt werden: die Zahl rollender Leukozyten war am 8. Tag um ein Drittel reduziert. Dieser Effekt war am letzten Untersuchungszeitpunkt, dem 10. Tag, am stärksten ausgeprägt. Die hochaffine Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel (fest am Endothel haftende Leukozyten) zeigte eine vergleichbare Reduktion. Die entzündungshemmende Wirkung von Clodronat-Liposomen wird nicht durch Bestandteile der liposomalen Membran verursacht, da Leer-Liposomen weder auf die intraokulare Entzündungssymptomatik noch auf die Zahl am Endothel entlang rollender bzw. fest haftender Leukozyten Einfluss hatten. Das zeigt, dass Liposomen nicht mit Adhäsionsmolekülen interagieren, die das Rollen oder die feste Haftung von Leukozyten am Endothel vermitteln. Übereinstimmend berichtet Malhotra über eine fehlende Bindungskapazität von Phosphatidylcholin an L- oder E-Selectin (Malhotra 1996).

CD4+-Lymphozyten (TH: „T-Helfer“) stellen die Mehrzahl der Leukozyten während früher Stadien der okulären Entzündung bei EMIU (McMenamin 1997b). Diese Lymphozyten produzieren ein breites Spektrum an Zytokinen. CD4+-Lymphozyten werden in zwei Subtypen (TH-1 und TH-2) eingeteilt, je nachdem welches Zytokinprofil von ihnen freigesetzt wird (D'Ambrosio 1999, Mosmann und Coffman 1989): Aktivierte TH-1-Zellen medieren Immunreaktionen vom verzögerten Typ (zelluläre Immunantwort) und setzen  $\text{IFN-}\gamma$ , IL-2 und  $\text{TNF-}\beta$  frei. TH-2-Zellen unterstützen B-Lymphozyten in der Antikörperproduktion (humorale Immunantwort) durch die Sekretion von IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10. Beide T-Zelltypen sind zur Produktion von IL-3,  $\text{TNF-}\alpha$  und GM-CSF fähig. TH-1 und TH-2 Zytokine haben eine gegenseitig inhibierende Wirkung. Beispielsweise verhindert  $\text{IFN-}\gamma$  die Proliferation von TH-2-Lymphozyten (Fernandez-Botran 1988) und umgekehrt IL-10 die klonale Expansion von TH-1-Lymphozyten (de Waal 1991). Die wechselseitige Regulation durch TH-Typ-Lymphokine erlaubt nur einem T-Zell-Subtyp, die Immunantwort gegenüber einem Antigen zu beherrschen.

Die Aktivierung von Makrophagen, zum Beispiel durch Antigenkontakt bzw. Antigenphagozytose oder durch Lymphokine ( $\text{IFN-}\gamma$ ), führt durch de novo Synthese von m-RNA zur Sekretion verschiedener immunregulierender Substanzen. Dazu gehören Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8,  $\text{TNF-}\alpha$ , GM-CSF,  $\text{TGF-}\beta$ ,  $\text{IFN-}\gamma$  (Beutler und Cerami 1988, Dinarello 1989a, Fausto 1991, Geissler 1989, Gessani und Belardelli 1998, Larsen 1989, Le und Vilcek 1989, Yoshida 1994). Der biologische Effekt dieser Substanzen auf Entzündungsreaktionen ist vielfältig und unter anderem davon abhängig, in welcher Kombination die entsprechenden Substanzen vorliegen. Auf immunkompetente Entzündungszellen wirken diese Effektorsubstanzen chemotaktisch und aktivitätsfördernd. Des weiteren werden durch sie die Proliferation und Differenzierung immunkompetenter Zellen wie T-Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten unterstützt.

Da besonders  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{IFN-}\gamma$  Schlüsselrollen während der Immunantwort einnehmen, wurden deren Kinetik im Blutplasma im Rahmen der hier vorliegenden Studie untersucht.  $\text{TNF-}\alpha$ , ein überwiegend durch aktivierte Makrophagen freigesetztes Zytokin, ist an der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen des Menschen und entsprechender Tiermodelle beteiligt. Beispiele sind die rheumatoide Arthritis (Feldmann 1998), die Enzephalomyelitis (Issazadeh 1995) und verschiedene Formen der Uveitis (Dick 1996, Nakamura 1994, Planck 1994, Wakefield 1999, Woon 1998).  $\text{TNF-}\alpha$  stimuliert Entzündungszellen und Zellen im Gewebsverband zur Zytokinsekretion (z.B.  $\text{IFN-}\gamma$ , IL-8). Als Folge wird eine aktivitätsfördernde und chemotaktisch wirkende Zytokinkaskade in Gang gesetzt, die Leukozyten und Endothelzellen zur verstärkten Expression von Adhäsionsmoleküle anregt und somit deren Migration in entzündliche Gewebe fördert (Adams und Lloyd 1997, Carlos und Harlan 1994, Paliard 1988).

TNF- $\alpha$  im Plasma von EMIU-Tieren ließ eine biphasische Kinetik innerhalb des Untersuchungszeitraumes von zehn Tagen erkennen. Der erste Gipfel von TNF- $\alpha$  am 4. Tag kann als Antwort aktivierter Makrophagen auf den Antigenkontakt angesehen werden. IFN- $\gamma$  ist ein von aktivierten Lymphozyten sezerniertes Lymphokin (Paliard 1988). Am 6. Tag stieg die IFN- $\gamma$ -Konzentration rapide an. Im weiteren Verlauf bis zur Manifestation der EMIU fiel dieser Wert langsam ab. Da am 4. Tag der erste Anstieg des Plasma-TNF- $\alpha$ -Spiegels zu verzeichnen war und in kurzer zeitlichen Folge Maximalwerte von IFN- $\gamma$  gemessen wurden, liegt es nahe, dass zu diesem Zeitpunkt nach vorangegangener Antigenprozessierung und -präsentation eine Aktivierung von CD4+T-Lymphozyten durch TNF- $\alpha$  stattgefunden hat. Auf Endothelzellen haben TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  insoweit Einfluss, als dass die Expression von MHC-Molekülen induziert wird und zusätzliche, die Emigration fördernde Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche exprimiert oder neusynthetisiert werden (Batten 1996, Doukas und Pober 1990, Paleolog 1992). Die intravitalmikroskopischen Beobachtungen mit einer steigenden Zahl rollender Leukozyten zum 6. Tag zeigt die Wirkung dieser Vorgänge auf die Mikrozirkulation. IFN- $\gamma$  wirkt synergistisch mit TNF- $\alpha$  und IL-1. Als positives Feedback-Signal verstärkt es gegen intrazelluläre Antigene gerichtete Abwehrfunktionen von Makrophagen (Nathan 1983). Daneben stellen IFN- $\gamma$ , MCP und IL-8 einen proliferationsfördernden und chemotaktischen Reiz für T-Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten dar. Sie migrieren dem Konzentrationsgefälle folgend zum Entzündungsort, verlassen das Gefäßbett und infiltrieren die betreffenden Gewebe (Becker 2000, Weiss 1998). Daraus resultiert eine relative Verschiebung der zellulären Blutbestandteile nach extravasal. In histologischen Präparaten von mit Melaninprotein immunisierten Tieren überwiegen T-Lymphozyten gegenüber anderen Entzündungszellen (McMenamin 1997b), was die konsekutive Abnahme des relativen Anteils der Lymphozyten im peripheren Blutbild erklären könnte.

Histologische Untersuchungen bei EMIU zeigen eine zunehmende Zahl monozytärer Zellen in Iris und Ziliarkörper während der Manifestation der EMIU (McMenamin 1997b). Die Proliferation und Rekrutierung von Lymphozyten, Granulozyten und besonders von Makrophagen in uveales Gewebe könnte zu dem zweiten, stärker ausgeprägten Anstieg des Plasma-TNF- $\alpha$  am 10. Tag führen. Broekhuysen konnte durch späte Makrophagendepletion die gewebsdestruktiven Effektorfunktionen von Makrophagen ausschließen (Broekhuysen 1997). Möglicherweise haben rekrutierte Makrophagen bei EMIU die Funktion, Zelltrümmer abzuräumen oder sie sind in Wundheilungsprozesse einbezogen. Bei einem anderen Modell der experimentellen Uveitis, der Endotoxin-induzierten Uveitis (EIU), sind verminderte entzündliche Veränderungen des Augenvorderabschnittes nach Makrophagendepletion mit liposomalem Clodronat nachweisbar (Pouvreau 1998, Salkowski 1995). Dennoch wurde durch Makrophagendepletion bei EIU die Proteinexsudation und Zellinfiltration in das Kammerwasser weit weniger supprimiert als in der vorliegenden Arbeit. Die EIU wird durch proinflammatorische Zytokine mediert, die nach Endotoxinreiz neben Makrophagen auch durch T-Lymphozyten, Mastzellen, Endothelzellen und Granulozyten freigesetzt werden. Im Fall der EIU zeigt eine Makrophagendepletion daher nur eine eingeschränkte antiinflammatorische Wirkung. Bei der EMIU hatte eine fortdauernde Behandlung mit liposomalem Clodronat weder am 8. noch am 10. Tag einen nennenswerten Anstieg von TNF- $\alpha$  im Blutplasma zur Folge, was die Depletion von Makrophagen widerspiegelt. Insofern wäre gleichermaßen der Signalfuss zu weiteren Entzündungszellen unterbunden, die Initiierung von Proliferation und Rekrutierung kann, wie in den vitalmikroskopischen Parametern und dem Differentialblutbild erkennbar, nicht stattfinden. Entsprechende Hinweise ergeben sich aus dem erst zum 10. Tag im Plasma nachweisbaren IFN- $\gamma$  bei mit Clodronat-Liposomen behandelten Tieren. Hierbei könnte es sich um eine durch noch vorhandene Makrophagenpopulationen stattgefundene Aktivierung von Entzündungszellen handeln. Weitere Ursachen des IFN- $\gamma$ -Anstiegs bestehen in der Präsentation des Antigens stellvertretend durch andere phagozytierende Zellen, die durch Clodronat unbeeinflusst bleiben.

Nach dem Zusammenbruch der Blut-Kammerwasser-Schranke infolge entzündlicher Veränderungen und des Endothelschadens ist zu erwarten, dass die Zytokinkonzentrationen im Kammerwasser ähnlich der im Blutplasma gemessenen sind. Ein paralleler Verlauf von TNF- $\alpha$  in Serum und Liquor ist bei der Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis nachweisbar (Villaroya 1996). Bei EMIU wurden bisher keine direkten Untersuchungen von Zytokinen im Kammerwasser vorgenommen. Woon et al. stellten jedoch eine gesteigerte TNF- $\alpha$ -mRNA-Synthese in Iris und Ziliarkörper bei vollständiger Manifestation der EMIU fest (Woon 1998). Demgegenüber war die IFN- $\gamma$ -mRNA-Synthese zu diesem Zeitpunkt in Iris und Ziliarkörper nur marginal erhöht, wogegen in peripheren Lymphknoten eine vielfach höhere Expression von IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden konnte. Es ist denkbar, dass als Antwort auf die Antigenexposition eine Aktivierung von TH-Lymphozyten peripher stattfindet.



In dieser Studie wurde erstmals die Methode der Intravitalmikroskopie an einem autoimmunologischen Entzündungsmodell angewandt, um die Leukozyten-Endothel-Interaktion zu untersuchen. Pathophysiologische Mechanismen der Zellrekrutierung zum Entzündungsort waren so direkt zu beobachten. Die verminderte Zahl rollender und fest haftender Leukozyten nach Makrophagen-depletion weist auf die entscheidende Rolle von Makrophagen während der Frühphase der EMIU hin. Die EMIU ist eine rekurrenzierende okuläre Entzündung. Weitere Studien werden zeigen, welche Bedeutung den Makrophagen im Rezidiv zukommt.

## 5 Zusammenfassung

Die Experimentelle Melaninprotein induzierte Uveitis (EMIU) ist ein Modell für die akute Uveitis anterior mit nichtinfektiöser Genese. In den Krankheitsprozess sind die Iris und die Choroidea involviert, die Netzhaut wird primär ausgespart. Es ist bekannt, dass Makrophagen eine entscheidende Funktion in der Pathogenese autoimmunologischer Krankheitsprozesse ausüben.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion bei der EMIU *in vivo* zu charakterisieren und zu quantifizieren. Die Studie sollte zusätzlich klären, inwieweit Makrophagen bei der EMIU Einfluss auf die Entzündungsreaktion und die Leukozyten-Endothel-Interaktion haben. Zu diesem Zweck wurden schon vor einer Immunisation mit Melanin-assoziiertem Protein Makrophagen depletiert. Clodronat-Liposomen sind für ihre selektiv makrophagentoxische Wirkung bekannt. Nach Internalisation der Liposomen wird Clodronat freigesetzt und löst den apoptotischen Zelltod aus.

Die EMIU wurde bei Lewisratten durch eine intraperitoneale Injektion einer Emulsion aus bovinem Melanin-assoziiertem Protein, komplettem Freund-Adjuvans und Pertussistoxin induziert. Die Intravital-Fluoreszenz-Mikroskopie ist eine gut geeignete Methode, um die Entzündungsreaktion auf mikrovaskulärer Ebene zu analysieren. Während der Frühphase der EMIU ermöglichte dieses Verfahren eine Analyse des Leukozytenverhaltens am vaskulären Endothel von postkapillären Irisvenolen am 4., 6., 8. und 10. Tagen nach Immunisation (p.i.). An den Tagen -2, 1, 4, 6 bzw. 8 p.i. wurden die Tiere mit liposomalem Clodronat behandelt. In Anschluss wurde am 8. und 10. Tag p.i. die vitalmikroskopische Quantifizierung der Leukozyten-Endothel-Interaktion durchgeführt. Der Zell- und Proteingehalt des Kammerwassers, das Differentialblutbild und die Konzentrationen von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  im Blutplasma wurden als zusätzliche Verlaufsparemeter bestimmt.

Die Methode der Intravitalmikroskopie ist bei der EMIU grundsätzlich bis zum 10. Tag p.i. anwendbar. Zu späteren Zeitpunkten wird die Bildqualität extrem durch die Exsudation von Fibrin in die Vorderkammer beeinflusst. In Spaltlampenuntersuchungen konnten keine Entzündungszeichen des Vorderabschnittes bei mit liposomalem Clodronat behandelten Tieren beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Tieren mit EMIU eine akute Entzündungssymptomatik mit Hornhautpräzipitaten und hinteren Synechien bis hin zur Ausbildung einer Iris bombata. Intravitalmikroskopisch war bei makrophagendepletierten Tieren eine Suppression der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion nachweisbar. Die Verlaufsparemeter Zellinfiltration und Proteinexsudation in das Kammerwasser waren ebenfalls stark erniedrigt.

Veränderungen der Leukozyten-Endothel-Interaktion können vor einem Anstieg von Zellen und Protein im Kammerwasser beobachtet werden. Das hier an der EMIU angewandte Behandlungsschema mit liposomalem Clodronat blockierte den Einfluss von Makrophagen auf die Entzündungsreaktion sehr effizient. Die vor der Immunisation mit Melanin-assoziiertem Antigen beginnende und bis zum erwarteten Entzündungsausbruch fortgeführte Makrophageneliminierung verhindert offenbar die Induktion der EMIU. Im Gegensatz dazu zeigte die in einer anderen EMIU-Studie zu einem späten Zeitpunkt und während der Manifestation der EMIU vorgenommene Makrophagendepletion keine Auswirkung auf die Entwicklung der Entzündungssymptomatik. Daher kann angenommen werden, dass Makrophagen die Initiatoren der intraokularen Entzündung bei EMIU sind. Die vorgenommene Makrophageneliminierung hatte einen supprimierenden Effekt auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion und verhinderte damit die Leukozytenrekrutierung in uveales Gewebe. Makrophagen präsentieren als „körperfremd“ erkannte Antigene gegenüber Mediator- und Effektorzellen und sezernieren proinflammatorische Zytokine. TNF- $\alpha$  zeigte am 4. Tag bei unbehandelten EMIU-Tieren vor allen anderen untersuchten Parametern ansteigende Werte. Es ist zu vermuten, dass zu diesem frühen Zeitpunkt eine Aktivierung der Makrophagen stattgefunden hat und dass Makrophagen Fragmente des Melanin-assoziierten Proteins gegenüber T-Lymphozyten präsentieren. Die entscheidende Rolle von Makrophagen in frühen Entzündungsstadien ist durch die periphere Aktivierung von T-Lymphozyten und anderen Effektorzellen sowie die Sekretion inflammatorisch wirkender Zytokine bedingt.

Die Ergebnisse dieser Studie unterstreichen die bedeutende Rolle von Makrophagen für die Initiation autoimmunologischer Entzündungsprozesse.

## Literaturverzeichnis

1. Adams DH, Lloyd AR (1997), Chemokines:leucocyte recruitment and activation cytokines, *Lancet* 349: 490-495
2. Alm A (1992), Ocular Circulation, in *Adler's Physiology of the Eye: clinical application*, ed. Hart Jr. WM, Mosby-Year-Book, Inc., St. Louis p 209-212
3. Avice MN, Sarfati M, Triebel F, Delespesse G, Demeure CE (1999), Lymphocyte activation gene-3, a MHC class II ligand expressed on activated T cells, stimulates TNF-alpha and IL-12 production by monocytes and dendritic cells., *The Journal Of Immunology* 162: 2748-2753
4. Baatz H, Pleyer U, Thiel HJ, Hammer C (1995), In vivo study of leukocyte-endothelium interaction in endotoxin-induced uveitis., *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 36: 1960-1967
5. Bartl R, Williams W (1997), Multiples Myelom, in *Therapie-Handbuch*, ed. Domschke W, Urban & Schwarzenberg, München
6. Batten P, Yacoub MH, Rose ML (1996), Effect of human cytokines (IFN-gamma, TNF-alpha, IL-1 beta, IL-4) on porcine endothelial cells: induction of MHC and adhesion molecules and functional significance of these changes., *Immunology* 87: 127-133
7. Baumheter S, Singer MS, Henzel W, Hemmerich S, Renz M, Rosen SD, Lasky LA (1993), Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34., *Science* 262: 436-438
8. Becker MD, O'Rourke LM, Blackman WS, Planck SR, Rosenbaum JT (2000), Reduced leukocyte migration, but normal rolling and arrest, in interleukin-8 receptor momologue knockout mice, *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 41: 1812-1817
9. Bensley SH (1960), Microscopic Studies of the Living Iris, *Anatomical record* 138: 39-48
10. Berg EL, McEvoy LM, Berlin C, Bargatze RF, Butcher EC (1993), L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1, *Nature* 366: 695-698
11. Beutler B, Cerami A (1988), The common mediator of shock, cachexia, and tumor necrosis, *Adv.Immunol.* 42: 213-231
12. Biewenga J, van der Ende MB, Krist LF, Borst A, Ghufron M, van Rooijen N (1995), Macrophage depletion in the rat after intraperitoneal administration of liposome-encapsulated clodronate: depletion kinetics and accelerated repopulation of peritoneal and omental macrophages by administration of Freund's adjuvant, *Cell Tissue Res.* 280: 189-196
13. Bloch-Michel E, Nussenblatt RB (1987), International uveitis study group recommendations for the evaluation of intraocular inflammatory disease, *Am.J.Ophthalmol.* 103: 234-235
14. Bora NS, Woon MD, Tandhasetti MT, Cirrito TP, Kaplan HJ (1997), Induction of experimental autoimmune anterior uveitis by a self-antigen: melanin complex without adjuvant., *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 38: 2171-2175
15. Bos HJ, van Bronswijk H, Helmerhorst TJ, Oe PL, Hoefsmit EC, Beelen RH (1988), Distinct subpopulations of elicited human macrophages in peritoneal dialysis patients and women undergoing laparoscopy: a study on peroxidatic activity., *J.Leukoc.Biol.* 43: 172-178
16. Breathnach SM (1988), The Langerhans cell., *Br.J.Dermatol.* 119: 463-469
17. Broekhuysse RM, Huitinga I, Kuhlmann ED, Rooijen NV, Winkens HJ (1997), Differential effect of macrophage depletion on two forms of experimental uveitis evoked by pigment epithelial membrane protein (EAPU), and by melanin-protein (EMIU)., *Exp.Eye Res.* 65: 841-848
18. Broekhuysse RM, Kuhlmann ED (1993), Experimental autoimmune anterior uveitis. The preparation of uveitogenic ocular melanin., *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 34: 698-700
19. Broekhuysse RM, Kuhlmann ED, Winkens HJ (1992), Experimental autoimmune anterior uveitis (EAAU). II. Dose-dependent induction and adoptive transfer using a melanin-bound antigen of the retinal pigment epithelium., *Exp.Eye Res.* 55: 401-411

20. Broekhuysse RM, Kuhlmann ED, Winkens HJ (1993a), Experimental autoimmune anterior uveitis (EAAU). III. Induction by immunization with purified uveal and skin melanins., *Exp.Eye Res.* 56: 575-583
21. Broekhuysse RM, Kuhlmann ED, Winkens HJ (1993b), Experimental autoimmune anterior uveitis (EAAU): induction by melanin antigen and suppression by various treatments., *Pigment Cell Res.* 6: 1-6
22. Broekhuysse RM, Kuhlmann ED, Winkens HJ (1996), Experimental melanin-protein induced uveitis (EMIU) is the sole type of uveitis evoked by a diversity of ocular melanin preparations and melanin-derived soluble polypeptides., *Jpn.J.Ophthalmol.* 40: 459-468
23. Broekhuysse RM, Kuhlmann ED, Winkens HJ, van Vugt AH (1991), Experimental autoimmune anterior uveitis (EAAU), a new form of experimental uveitis. I. Induction by a detergent-insoluble, intrinsic protein fraction of the retinal pigment epithelium., *Exp.Eye Res.* 52: 465-474
24. Broekhuysse RM, Winkens HJ, Kuhlmann ED (1995), Multiple recurrences in melanin-protein-induced uveitis in the rat, *Ocular Immunology and Inflammation* 3: 149-155
25. Butler TL, McMenamin PG (1996), Resident and infiltrating immune cells in the uveal tract in the early and late stages of experimental autoimmune uveoretinitis, *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 37: 2195-2210
26. Calder VL, Prickett TC, McKenzie JL, Hart DN (1993), Analysis of cytokine and cytokine receptor production by human dendritic cells., *Adv.Exp.Med.Biol.* 329: 81-85
27. Carlos TM, Harlan JM (1994), Leukocyte-endothelial adhesion molecules., *Blood* 84: 2068-2101
28. Caspi RR (1999), Immune mechanisms in uveitis, *Springer Semin.Immunopathol.* 21: 113-124
29. Castenholz A (1966), [Vital microscopic studies of the anterior bulbus section of small albino rodents. Basis of methods and description of apparatus arrangement], *Z.Wiss.Mikrosk.* 67: 78-91
30. Chan CC, Hikita N, Dastgheib K, Whitcup SM, Gery I, Nussenblatt RB (1994), Experimental melanin-protein-induced uveitis in the Lewis rat. Immunopathologic processes, *Ophthalmology.* 101: 1275-1280
31. Chan CC, Li Y, Sun B, Li Q, Matteson DM, Shen DF, Nussenblatt RB, Zhai Y (1998), Recombinant adenovirus encoding gp100 modulates experimental melanin-protein induced uveitis (EMIU)., *J.Autoimmun.* 11: 111-118
32. Claassen I, van Rooijen N, Claassen E (1990), A new method for removal of mononuclear phagocytes from heterogenous cell populations in vitro, using the liposome-mediated macrophage "suicide" technique, *J.Immunol.Methods* 134: 153-161
33. Collins RC (1949), Experimental studies on sympathetic ophthalmia., *Am.J.Ophthalmol.* 32: 1687-1699
34. Csaky K, Nussenblatt RB (1999), Gene therapy in the treatment of ocular inflammation, *Springer Semin.Immunopathol.* 21: 191-197
35. D'Ambrosio D, Panina BP, Rogge L, Sinigaglia F (1999), Molecular mechanisms of T helper cell differentiation and tissue-specific migration., *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 246: 117-122
36. Darrell RW, Wagener HP, Kurland LT (1962), Epidemiology of uveitis, incidence and prevalence in a small urban community, *Arch.Ophthalmol.* 68: 502
37. de-Saint VB, Fugier VI, Massacrier C, Gaillard C, Vanbervliet B, Ait YS, Banchereau J, Liu YJ, Lebecque S, Caux C (1998), The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation., *The Journal Of Immunology* 160: 1666-1676
38. de Waal MR, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, Te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries J (1991), IL-10 and viral IL-10 strongly reduce antigen specific human T cells proliferation by demishing the antigen presenting capacity of monocytes via downregulation of class II MHC expression, *J.Exp.Med.* 174: 915-924

39. Deleamarre FG, Kors N, van Rooijen N (1990), Elimination of spleen and of lymph node macrophages and its difference in the effect on the immune response to particulate antigens., *Immunobiology* 182: 70-78
40. Demeure CE, Tanaka H, Mateo V, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M (2000), CD47 engagement inhibits cytokine production and maturation of human dendritic cells., *The Journal Of Immunology* 164: 2193-2199
41. Dick AD, McMenamin PG, Korner H, Scallon BJ, Ghrayeb J, Forrester JV, Sedgwick JD (1996), Inhibition of tumor necrosis factor activity minimizes target organ damage in experimental autoimmune uveoretinitis despite quantitatively normal activated T cell traffic to the retina., *Eur.J.Immunol.* 26: 1018-1025
42. Dijkstra CD, Dopp EA, Huitinga I, Damoiseaux JG (1992), Macrophages in experimental autoimmune diseases in the rat: a review, *Curr.Eye Res.* 11 Suppl: 75-79
43. Dijkstra CD, Dopp EA, Joling P, Kraal G (1985), The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3., *Immunology* 54: 589-599
44. Dinarello CA (1989a), Interleukin-1 and its biologically related cytokines, *Adv.Immunol.* 44: 153-205
45. Dinarello CA, Orencole SF, Savage N (1989b), Interleukin-1 induced T-lymphocyte proliferation and its relation to IL-1 receptors., *Adv.Exp.Med.Biol.* 254: 45-53
46. Doukas J, Pober JS (1990), Lymphocyte-mediated activation of cultured endothelial cells (EC). CD4+ T cells inhibit EC class II MHC expression despite secreting IFN-gamma and increasing EC class I MHC and intercellular adhesion molecule-1 expression., *The Journal Of Immunology* 145: 1088-1098
47. Elschnig A (1910), Studien zur sympathischen Ophthalmie. II. Die antigene Wirkung des Augenpigments., *Graefes.Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.* 76:509:
48. Fausto N (1991), Multifunctional roles of transforming growth factor- $\beta$ 1, *Lab.Invest.* 65: 497-499
49. Feldmann M, Charles P, Taylor P, Maini RN (1998), Biological insights from clinical trials with anti-TNF therapy., *Springer Semin Immunopathol* 20: 211-228
50. Fernandez-Botran R, Sanders VM, Mosmann TR, Vitetta ES (1988), Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells, *J.Exp.Med.* 168: 543-558
51. Fidler IJ (1977), Depression of macrophages in mice drinking hyperchlorinated water, *Nature* 270: 735
52. Fleisch H (1988), Biphosphonates: a new class of drugs in diseases of bone and calcium metabolism, in *Handbook Exp. Pharmacol.*, ed. Baker P, Springer Verlag, Heidelberg p 441-466
53. Fleisch H (1997), *Biphosphonates in Bone Disease*, New York
54. Fleisher LN, Ferrell JB, McGahan MC (1990), Ocular inflammatory effects of intravitreally injected tumor necrosis factor-alpha and endotoxin., *Inflammation* 14: 325-335
55. Forrester JV, Liversidge J, Dua HS, Towler H, McMenamin PG (1990), Comparison of clinical and experimental uveitis, *Curr.Eye Res.* 9 Suppl: 75-84
56. Forrester JV, McMenamin PG, Liversidge J, Lumsden L (1993), Dendritic cells and "dendritic" macrophages in the uveal tract, *Adv.Exp.Med.Biol.* 329: 599-604
57. Funk RHW, Apple DJ, Naumann GOH (1997), Embryologie, Anatomie und Untersuchungstechniken, in *Pathologie des Auges - Bd.1*, ed. Naumann GOH, Springer, Berlin, Heidelberg, New York p 1-79
58. Geissler K, Harrington M, Srivastava C, Leemhuis T, Tricot G, Broxmeyer HG (1989), Effects of recombinant human colony stimulating factors (CSF) (granulocyte-macrophage CSF, granulocyte CSF, and CSF-1) on human monocyte/macrophage differentiation, *The Journal Of Immunology* 143: 140-146

59. Gessani S, Belardelli F (1998), IFN- $\gamma$  Expression in Macrophages and its Possible Biological Significance, *Cytokine.Growth Factor.Rev.* 9: 117-123
60. Hammer RE, Maika SD, Richardson JA, Tang J-P, Taurog JD (1990), Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing expressing HLA-B27 and human beta-2 microglobulin: an animal model of HLA-B27-associated human disorders., *Cell* 63: 1099
61. Harlan JM (1985), Leukocyte-endothelial interactions., *Blood* 65: 513-525
62. Hart DN, Prickett TC (1993a), Adhesion molecules in tonsil DC-T cell interactions., *Adv.Exp.Med.Biol.* 329: 65-69
63. Hart DN, Prickett TC (1993b), Intercellular adhesion molecule-2 (ICAM-2) expression on human dendritic cells., *Cell Immunol.* 148: 447-454
64. Havenith CE, Breedijk AJ, Hoefsmit EC (1992), Effect of Bacillus Calmette-Guerin inoculation on numbers of dendritic cells in bronchoalveolar lavages of rats., *Immunobiology* 184: 336-347
65. Huitinga I, Damoiseaux JG, van Rooijen N, Dopp EA, Dijkstra CD (1992), Liposome mediated affection of monocytes, *Immunobiology* 185: 11-19
66. Huitinga I, Ruuls SR, Jung S, van Rooijen N, Hartung HP, Dijkstra CD (1995), Macrophages in T cell line-mediated, demyelinating, and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats, *Clin.Exp.Immunol.* 100: 344-351
67. Hurst M, Noble S (1999), Clodronate: a review of its use in breast cancer., *Drugs Aging* 15: 143-167
68. Illig L, Conraths H (1958), *Mikroskopische Lebendaufnahmen vom Kapillarbett des Tieres und des Menschen. Normale und pathologische Bilder von den kleinsten Blutgefäßen des Säugetier Mesenteriums*, Boehringer, Ingelheim,
69. Issazadeh S, Ljungdahl A, Hojeberg B, Mustafa M, Olsson T (1995), Cytokine production in the central nervous system of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis: dynamics of mRNA expression for interleukin-10, interleukin-12, cytolysin, tumor necrosis factor  $\alpha$  and tumor necrosis factor  $\beta$ , *J.Neuroimmunol.* 154: 205-212
70. Jaffe GJ, Yang C-S, Want X-C, Cousins SW, Gallemore RP, Ashton P (1998), Intravitreal sustained-release cyclosporin in the treatment of experimental uveitis, *Ophthalmology.* 105: 46
71. Jung S, Huitinga I, Schmidt B, Zielasek J, Dijkstra CD, Toyka KV, Hartung HP (1993), Selective elimination of macrophages by dichlormethylene diphosphonate-containing liposomes suppresses experimental autoimmune neuritis, *J.Neurol.Sci.* 119: 195-202
72. Keller R (1990), Mechanism of macrophage-mediated tumor cell killing: a comparative analysis of the role of reactive nitrogen intermediates and TNF, *Int.J.Cancer* 46: 682-695
73. Kim MC, Bora NS, Kabeer NH, Kaplan HJ (1994), Sequential expression of ICAM-1, LFA-1, MHC-II molecules in the pathogenesis of experimental allergic iritis (EAI), in *Advances in Ocular Immunology*, ed. Nussenblatt RB, Whitcup SM, Caspi RR, and Gery I, Elsevier, p 95-98
74. Kim MC, Kabeer NH, Tandhasetti MT, Kaplan HJ, Bora NS (1995), Immunohistochemical studies on melanin associated antigen (MAA) induced experimental autoimmune anterior uveitis (EAAU)., *Curr.Eye Res.* 14: 703-710
75. Konstantopoulos K, McIntire LV (1997), Effects of fluid dynamic forces on vascular cell adhesion., *J.Clin.Invest.* 100: S19-S23
76. Küchle M, Naumann GOH (1997), Intraokulare Entzündungen, in *Pathologie des Auges - Bd.1*, ed. Naumann GOH, Springer, Berlin, Heidelberg, New York p 143-267
77. Larsen CG, Anderson AO, Apella AE, Oppenheim JJ, Matsushima K (1989), The neutrophil activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T-lymphocytes, *Science* 243: 1464-1466
78. Lasky LA, Singer MS, Dowbenko D, Imai Y, Henzel W, Fennie C, Watson S, Rosen SD (1992), Glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1: a novel mucin-like adhesion ligand for L-selectin., *Cold Spring Harb.Symp.* 57: 259-269

79. Lawrence MB, Springer TA (1991), Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins., *Cell* 65: 859-873
80. Le J, Vilcek J (1989), Interleukin 6: a multifunctional cytokine regulating immune reaction and the acute phase protein response, *Lab.Invest.* 61: 588-602
81. Ley K, Gaehtgens P, Fennie C, Singer MS, Lasky LA, Rosen SD (1991), Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo., *Blood* 77: 2553-2555
82. Malhotra R, Taylor NR, Bird MI (1996), Anionic phospholipids bind to L-selectin (but not E-selectin) at a site distinct from the carbohydrate-binding site, *Biochem.J.* 314 ( Pt 1): 297-303
83. Martenet AC (1966), [Experimental herpetic uveitis. Thoughts on a model] Uveite herpetique experimentale. Reflexions sur un modele., *Ophthalmologica* 152: 283-290
84. Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD (1993), Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice, *Cell* 74: 541-554
85. Mayrovitz HN (1992), Leukocyte rolling: A prominent feature of venules in intact skin of anesthetized hairless mice., *The American Physiological Society* 262: H157-H161
86. McAllister CG, Vistica BP, Sekura R, Kuwabara T, Gery I (1986), The effects of pertussis toxin on the induction and transfer of experimental autoimmune uveoretinitis., *Clin.Immunol.Immunopathol* 39: 329-336
87. McMenamin C, Broekhuysen RM, Forrester JV (1993a), Ultrastructural pathology of experimental autoimmune uveitis: A Review, *Micron* 24: 521-546
88. McMenamin PG (1997a), The distribution of immune cells in the uveal tract of the normal eye, *Eye* 11: 183-193
89. McMenamin PG (1999), Dendritic cells and macrophages in the uveal tract of the normal mouse eye, *Br.J.Ophthalmol.* 83: 598-604
90. McMenamin PG, Crewe J, Kijlstra A (1997b), Resident and infiltrating cells in the rat iris during the early stages of experimental melanin protein-induced uveitis (EMIU)., *Ocul.Immunol.Inflamm.* 5: 223-233
91. McMenamin PG, Crewe J, Morrison S, Holt PG (1994), Immunomorphologic studies of macrophages and MHC class II-positive dendritic cells in the iris and ciliary body of the rat, mouse, and human eye., *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 35: 3234-3250
92. McMenamin PG, Forrester JV, Steptoe R, Dua HS (1993b), Ultrastructural pathology of experimental autoimmune uveitis in the rat, *Autoimmunity.* 16: 83-93
93. McMenamin PG, Holthouse I, Holt PG (1992), Class II major histocompatibility complex (Ia) antigen-bearing dendritic cells within the iris and ciliary body of the rat eye: distribution, phenotype and relation to retinal microglia., *Immunology* 77: 385-393
94. Menger MD, Lehr HA (1993), Scope and perspectives of intravital microscopy--bridge over from in vitro to in vivo., *Immunology Today* 14: 519-522
95. Moore KL, Stults NL, Diaz S, Smith DF, Cummings RD, Varki A, McEver RP (1992), Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells., *J.Cell Biol.* 118: 445-456
96. Mosmann TR, Coffman RL (1989), TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties, *Annu.Rev.Immunol.* 7: 145-173
97. Mönkkönen J, Heath TD (1993), The effect of liposome-encapsulated and free clodronate on the growth of macrophage like cells in vitro: The role of calcium and iron, *Calcif.Tissue Int.* 53: 139
98. Munoz JJ (1988), Action of pertussigen (pertussis toxin) on the host immune system, in *Pathogenesis and Immunity in Pertussis*, ed. Wardlaw AC and Parton R, John Wiley & Sons, London p 173-192
99. Nakamura S, Yamakawa T, Sugita M, Kijima M, Ishioka M, Tanaka S, Ohno S (1994), The role of tumor necrosis factor-alpha in the induction of experimental autoimmune uveoretinitis in mice, *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 35: 3884-3889



100. Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY (1983), Identification of interferon-g as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity, *J.Exp.Med.* 158: 670-689
101. Nussenblatt RB, Caspi RR, Mahdi RM (1990), Inhibition of S-antigen induced experimental autoimmune uveoretinitis by oral induction of tolerance with S-antigen, *The Journal Of Immunology* 144: 1689
102. Paleolog EM, Aluri GR, Feldmann M (1992), Contrasting effects of interferon gamma and interleukin 4 on responses of human vascular endothelial cells to tumour necrosis factor alpha., *Cytokine.* 4: 470-478
103. Paliard X, de Waal MR, Yssel H, Blanchard D, Chretien I, Abrams J, de VJ, Spits H (1988), Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones., *The Journal Of Immunology* 141: 849-855
104. Pavan LD (1968), Mycoplasma in the etiology of anterior and posterior uveitis: an experimental model., *Arch.Ophthalmol.* 80: 416
105. Pelger RC, Hamdy NA, Zwiderman AH, Lycklama, Papapoulos SE (1998), Effects of the bisphosphonate olpadronate in patients with carcinoma of the prostate metastatic to the skeleton., *Bone* 22: 403-408
106. Pelorgeas S, Martin JB, Satre M (1992), Cytotoxicity of dichlormethane diphosphonate and of 1-hydroxyethane-1,1-diphosphonate in the amoebae of the slime mould *Dictyostelium discoideum*, *Biochem.Pharmacol.* 44: 2157
107. Pierce GF, Mustoe TA, Lingelbach J, Masakowski VR, Griffin GL, Senior RM, Deuel TF (1989), Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta enhance tissue repair activities by unique mechanisms., *J.Cell Biol.* 109: 429-440
108. Planck SR, Huang XN, Robertson JE, Rosenbaum JT (1994), Cytokine mRNA levels in rat ocular tissues after systemic endotoxin treatment, *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 35: 924-930
109. Plasman N, Vray B (1993), Mouse peritoneal macrophages: characterization of functional subsets following Percoll density gradients., *Res.Immunol.* 144: 151-163
110. Pouvreau I, Zech JC, Thillaye GB, Naud MC, van RN, de KY (1998), Effect of macrophage depletion by liposomes containing dichloromethylene-diphosphonate on endotoxin-induced uveitis, *J.Neuroimmunol.* 86: 171-181
111. Qian Q, Jutila MA, van RN, Cutler JE (1994), Elimination of mouse splenic macrophages correlates with increased susceptibility to experimental disseminated candidiasis, *The Journal Of Immunology* 152: 5000-5008
112. Rogers MJ, Russel RG, Blackburn GM, Williamson MP, Watts DJ (1992), Metabolism of halogenated bisphosphonates by the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 189: 414-423
113. Rosenbaum JT, Howes-EL J, Rubin RM, Samples JR (1988), Ocular inflammatory effects of intravitreally-injected tumor necrosis factor., *American Journal of Pathology* 133: 47-53
114. Rosenbaum JT, McDevitt HO, Guss RB, Egbert PR (1980), Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease., *Nature* 286: 611-613
115. Rummelt V, Naumann GOH (1997), Uvea, in *Pathologie des Auges - Bd.1*, ed. Naumann GOH, Springer, Berlin, Heidelberg, New York p 693-844
116. Saito T, Yamaguchi J (1985), 2-Chloroadenosine: A selective lethal effect to mouse macrophages and its mechanism, *The Journal Of Immunology* 134: 1815
117. Salkowski CA, Neta R, Wynn TA, Strassmann G, van RN, Vogel SN (1995), Effect of liposome-mediated macrophage depletion on LPS-induced cytokine gene expression and radioprotection, *The Journal Of Immunology* 155: 3168-3179
118. Samples JR, Boney RS, Rosenbaum JT (1993), Ocular inflammatory effects of intravitreally injected interleukin-2, *Curr.Eye Res.* 12: 649-654
119. Schmidt-Weber CB, Rittig M, Buchner E, Hauser I, Schmidt I, Palombo KE, Emmrich F, Kinne RW (1996), Apoptotic cell death in activated monocytes following incorporation of clodronate-liposomes, *J.Leukoc.Biol.* 60: 230-244

120. Shane E, Rodino MA, McMahon DJ, Addesso V, Staron RB, Seibel MJ, Mancini D, Michler RE, Lo SH (1998), Prevention of bone loss after heart transplantation with antiresorptive therapy: a pilot study., *J.Heart Lung Transplant.* 17: 1089-1096
121. Shimotsuma M, Takahashi T, Kawata M, Dux K (1991), Cellular subsets of the milky spots in the human greater omentum., *Cell Tissue Res.* 264: 599-601
122. Smit RLMJ, Baarsma GS, de Vries J (1993), Classification of 750 consecutive uveitis patients in the Rotterdam Eye Hospital, *Int.Ophthalmol.* 71-75
123. Soesatyo M, Biewenga J, van Rooijen N, Kors N, Sminia T (1991), The in situ immune response of the rat after intraperitoneal depletion of makrophages by liposome-encapsulated dichlormethylen diphosphonate, *Res.Immunol.* 142: 533-540
124. Springer TA (1994), Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm, *Cell* 76: 301-314
125. Steptoe RJ, Holt PG, McMenamin PG (1995), Functional studies of major histocompatibility class II-positive dendritic cells and resident tissue macrophages isolated from the rat iris, *Immunology* 85: 630-637
126. Suttorp SM, Rothova A (1996), The possible impact of uveitis in blindness: a literature survey., *Br.J.Ophthalmol.* 80: 844-848
127. Thepen T, van Rooijen N, Kraal G (1990), Alveolar macrophage elimination in vivo is associated with an increase in pulmonary immune response in mice, *J.Exp.Med.* 170: 499-509
128. Torres PF, Slegers TPAM, Peek R, van Rooijen N, van der Gaag R, Kijlstra A, De Vos AF (1999), Changes in cytokine mRNA levels in experimental corneal allografts after local clodronat-liposome treatment, *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 40: 3194-3201
129. Trentham DE, Dynesius-Trentham RA, Orav EJ (1993), Effect of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis, *Science* 261: 1727
130. Unanue ER (1984), Antigen-presenting function of the macrophage, *Annu.Rev.Immunol.* 2: 395-428
131. Unanue ER, Allen PM (1987), The basis of immunomodulatory role of macrophages and other accessory cells, *Science* 236: 551-557
132. Vadot E (1992), Epidemiology of intermediate uveitis: a prospective study in Savoy, *Dev.Ophthalmol.* 23: 33-34
133. van de Loosdrecht AA, Beelen RH, Ossenkoppele GJ, Broekhoven MG, Langenhuysen MMAC (1993), Cellular and cytotoxic dependent monocyte mediated leukemic cell death: modulation by IFN and TNF, *Exp.Hematol.* 21: 461-468
134. van de Loosdrecht AA, Ossenkoppele GJ, Beelen RHJ, Langenhuysen MMAC (1992), Monocyte mediated cytotoxicity against a human histiocytic lymphoma cell line. Role of interferon- $\delta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ , *Cancer Immunol.Immunother.* 34: 393-398
135. van der Veen G, Broersma L, Dijkstra CD, van Rooijen N, van Rij G, van der Gaag R (1994), Prevention of corneal allograft rejection in rats treated with subconjunctival injections of liposomes containing dichloromethylene diphosphonate., *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 35: 3505-3515
136. Van Geldern RN, Kaplan HJ (1999), Immunosuppression in uveitis therapy, *Springer Semin.Immunopathol.* 21: 179-190
137. van Lent PLEM, van den Bersselaar LAM, Holthuyzen AEM, van Rooijen N, van de Putte LBA, van den Berg WB (1994), Phagocytic synovial lining cells in experimentally induced chronic arthritis: down-regulation of synovitis by Cl<sub>2</sub>MDP-liposomes, *Scand.J.Rheumatol.* 23: 83-89
138. van Rooijen N (1989a), The liposome-mediated macrophage 'suicide' technique, *J.Immunol.Methods* 124: 1-6
139. van Rooijen N (1992), Liposomes as an in vivo tool to study and manipulate macrophage function, *Res.Immunol.* 143: 177-178

140. van Rooijen N (1993), Extracellular and intracellular action of clodronate in osteolytic bone disease? A hypothesis, *Calcif. Tissue Int.* 52: 407
141. van Rooijen N, Kors N, Ende M, Dijkstra CD (1990), Depletion and repopulation of macrophages in spleen and liver of rat after intravenous treatment with liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate, *Cell Tissue Res.* 260: 215-222
142. van Rooijen N, Kors N, Kraal G (1989b), Macrophage subset repopulation in the spleen: differential kinetics after liposome-mediated elimination, *J.Leukoc.Biol.* 45: 97-104
143. van Rooijen N, Poppema A (1992), Efficacy of various water-soluble chelator molecules in the liposome-mediated macrophage "suicide" technique, *J.Pharmacol.Toxicol.Methods* 28: 217
144. van Rooijen N, Sanders A (1994), Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications, *J.Immunol.Methods* 174: 83-93
145. Vezzio N, Sarfati M, Yang LP, Demeure CE, Delespesse G (1996), Human Th2-like cell clones induce IL-12 production by dendritic cells and may express several cytokine profiles., *Int.Immunol.* 8: 1963-1970
146. Villaroya H, Violleau K, Ben Younes-Chennoufi A, Baumann N (1996), Myelin-induced experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats: tumor necrosis factor levels in serum and cerebrospinal fluid - Immunohistochemical expression in glial cells and macrophages of optic nerve and spinal cord, *J.Neuroimmunol.* 64: 55-61
147. von Andrian UH, Berger EM, Ramezani L, Chambers JD, Ochs HD, Harlan JM, Paulson JC, Etzioni A, Arfors KE (1993), In vivo behavior of neutrophils from two patients with distinct inherited leukocyte adhesion deficiency syndromes., *J.Clin.Invest.* 91: 2893-2897
148. Wakefield D, Cuello C, Di Girolamo N, Lloyd A (1999), The Role of Cytokines and Chemokines in Uveitis, *Dev.Ophthalmol.* 31: 53-66
149. Weiner HL, Mackin GA, Matsui (1993), Double-blind pilot trial of oral tolerization with myelin antigens in multiple sclerosis, *Science* 259: 1321
150. Weiss JM, Downie SA, Lyman WD, Berman JW (1998), Astrocyte-derived monocyte-chemoattractant protein-1 directs the transmigration of leukocytes across a model of the human blood-brain barrier., *The Journal Of Immunology* 161: 6896-6903
151. Whitcup SM, Kozhich AT, Lobanoff M, Wolitzky BA, Chan CC (1997), Blocking both E-selectin and P-selectin inhibits endotoxin-induced leukocyte infiltration into the eye., *Clin.Immunol.Immunopathol.* 83: 45-52
152. Wijffels JF, Hendrickx RJ, Steenbergen JJ, Eestermans IL, Beelen RH (1992), Milky spots in the mouse omentum may play an important role in the origin of peritoneal macrophages., *Res.Immunol.* 143: 401-409
153. Wildner G, Thureau SR (1994), Cross-reactivity between an HLA-B27-derived peptide and a retinal autoantigen peptide: a clue to major histocompatibility complex association autoimmune disease, *Eur.J.Immunol.* 24: 2579-2585
154. Woon MD, Kaplan HJ, Bora NS (1998), Kinetics of cytokine production in experimental autoimmune anterior uveitis (EAAU)., *Curr.Eye Res.* 17: 955-961
155. Woon MD, Kaplan HJ, Bora NS. 22kD Protein Associated With Bovine Iris/Ciliary Body Melanin Causes Experimental Anterior Uveitis. ARVO Abstract Book , S142. 1999.
156. Yokota K, Ariizumi K, Kitajima T, Bergstresser PR, Street NE, Takashima A (1996), Cytokine-mediated communication between dendritic epidermal T cells and Langerhans cells. In vitro studies using cell lines., *The Journal Of Immunology* 157: 1529-1537
157. Yoshida M, Yoshimura N, Hangai M, Tanihara H, Honda Y (1994), Interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and tumor necrosis factor gene expression in endotoxin-induced uveitis., *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 35: 1107-1113

## Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater, Herrn Oberarzt Prof. Dr. med. **Uwe Pleyer**, Universitäts-Augenklinik Charité, für die Unterstützung und seine starkes Interesse an diesem Projekt. Sein außerordentliches Fachwissen war mir bei der Planung und Umsetzung der Experimente sehr hilfreich.

Mein spezieller Dank geht an Herrn Oberarzt Dr. med. **Holger Baatz**, Universitäts-Augenklinik Frankfurt am Main, der mich nicht nur für die wissenschaftliche Arbeit im Fachgebiet der Augenheilkunde begeisterte, sondern sie auch stets mit persönlichem Engagement und Kompetenz begleitete und förderte. Jederzeit stand seine Tür für anstehende Fragen und kritische Diskussionen offen.

Frau Dr. **Regina Reszka**, Leiterin der Arbeitsgruppe „Drug targeting“ am Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch gilt mein besonderer Dank für ihr Entgegenkommen bei der Bereitstellung der für die Liposomenherstellung notwendigen Apparaturen.

In diesem Zusammenhang möchte ich Frau **Jana Richter** (MTA) danken, die mich mit großer Geduld und Sorgfalt in die technischen Details der Herstellung von Liposomen einführte. Desgleichen gilt mein Dank der **Firma Boehringer-Mannheim** für das freundliche Überlassen der für diese Studie notwendigen Menge Clodronat.

Im Besonderen danke ich Frau **Beate Edelmann** und allen Mitarbeitern des Forschungslabors der Augenklinik Charité (Ziegelstrasse 9) für die hilfreiche Unterstützung meiner Arbeit und die angenehme Zusammenarbeit.

Herr Prof. Dr. Dr.(F) **Christian Hartmann** schließlich versteht es als Direktor der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Charité, jene Möglichkeiten zu schaffen, die für wissenschaftliches Arbeiten unabdingbar sind. Sein beständiges Interesse gilt dabei sowohl der wissenschaftlichen Diskussion als auch seinen Mitarbeitern. Ihm sei an dieser Stelle ebenfalls herzlich gedankt.

## Lebenslauf

Geburtsdatum/-ort: 27. Juli 1972 in Dresden  
 Eltern: Dipl.- Ing. Hans-Peter Puchta, Architekt  
 Dr. med. Barbara Puchta, geb. Kessler, Fachärztin für Augenheilkunde  
 Geschwister: Dipl.- Ing. Ulrike Deckert, Architektin  
 Nationalität: deutsch

---

1979 – 1989	Polytechnische Oberschule, Dresden
1989 – 1991	Evangelisches Kreuzgymnasium Dresden
1991 – 1992	Zivildienst an der Klinik für Chirurgie, Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden
1993	Immatrikulation zum Humanmedizinstudium an der Charité, Medizinischen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin
1995	Ärztliche Vorprüfung
1996	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
5/1999	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
5/1999	Beginn des Praktischen Jahres (PJ): <div style="margin-left: 40px;"> <i>Chirurgie:</i> Kreisspital Männedorf, Schweiz            (Prof. Dr. Hollinger)    <i>Augenheilkunde:</i> Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der            Charité, Humboldt-Universität zu Berlin            (Prof. Dr. Dr. Hartmann)    <i>Innere Medizin:</i> evangelisches Krankenhaus Königin Elisabeth            Herzberge, Berlin            (Prof. Dr. Schulte)         </div>
5/2000	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
7/2000 – 5/2001	Arzt im Praktikum, Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Charité, Humboldt-Universität zu Berlin (Prof. Dr. Dr. Hartmann)
6/2001	Arzt im Praktikum, Klinik für Augenheilkunde der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main (Prof. Dr. Ohrloff)
1/2002	Arzt in Weiterbildung, Klinik für Augenheilkunde der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main (Prof. Dr. Ohrloff)

## Vorabveröffentlichungen

J. Puchta, H. Baatz, U. Pleyer, Chr. Hartmann, Leukocyte-endothelium interaction in experimental melanin-induced uveitis. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 1999;40(4): S142

H. Baatz, J. Puchta, U. Pleyer, Chr. Hartmann, Leukocyte-endothelium interaction in experimental melanin-induced uveitis. *Ophthalmic Res.* 1999;31 (Suppl.1)

J. Puchta, U. Pleyer, R. Reszka, H. Baatz, Makrophagendepletion mit liposomalem Clodronat hemmt die Leukozyten-Endothel-Interaktion bei Experimenteller Melanininduzierter Uveitis (EMIU). *Ophthalmologe* 2000;97: S96

J. Puchta, U. Pleyer, R. Reszka, H. Baatz, Suppression of experimental melanin-induced uveitis (EMIU) after macrophage depletion with liposomal clodronate *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 2001;42(4): S914

H. Baatz, J. Puchta, R. Reszka, U. Pleyer, Macrophage depletion prevents leukocyte adhesion and disease induction in experimental melanin-protein-induced uveitis. *Exp. Eye Res.* 2001; 73:101-109

J. Puchta, U. Pleyer, R. Reszka, H. Baatz, Makrophagendepletion hemmt die Leukozytenrekrutierung bei Experimenteller Melanin-induzierter Uveitis (EMIU). *Ophthalmologe* (zur Publikation eingereicht)

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde. Des Weiteren stellt die Schrift auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.